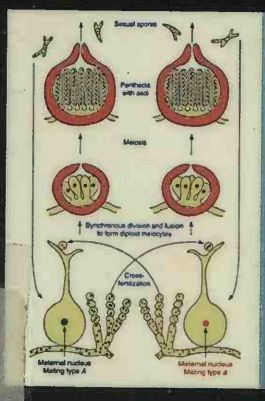
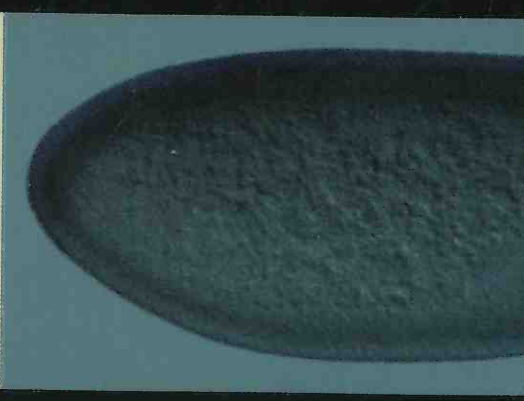
INTRODUCTION À L'ANALYSE GÉNÉTIQUE

• GRIFFITHS • MILLER •
• SUZUKI • LEWONTIN •
• GELBART •

Traduction de la 6e édition américaine
par Raymond Cunin, Nicolas Glansdorff, André Piérard et Michel Jacobs
avec la collaboration de Cristina Purcarea





B.U. ORLEANS
D 010 177807 6

IV-14.051

De Boeck Université

Chez le même éditeur

CAMPBELL A..
BIOLOGIE

WATSON J.D., GILMAN M., WITKOWSKI J.
ADN RECOMBINANT

DARNELL J., LODISH H., BALTIMORE D.
BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE LA CELLULE, 3e édition

DE DUVE CH.
UNE VISITE GUIDÉE DE LA CELLULE VIVANTE

DE DUVE CH.
CONSTRUIRE UNE CELLULE

CROSS P.C., MERCER R.
ULTRASTRUCTURE CELLULAIRE ET TISSULAIRE

BRANDEN C., TOOZE J.
INTRODUCTION À LA STRUCTURE DES PROTÉINES

GILBERT S.F.
BIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INTRODUCTION À L'ANALYSE GÉNÉTIQUE

• GRIFFITHS • MILLER •
• SUZUKI • LEWONTIN •
• GELBART •

Traduction de la 6e édition américaine
par Raymond Cunin, Nicolas Glansdorff, André Piérard
et Michel Jacobs

avec la collaboration de Cristina Purcarea

0 000008 28326 BCU IASI

B.U. ORLÉANS SCIENCES
INV. S99-1014
Cote Mag. E 7545
Cote Salle 576.5 INT

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

De Boeck Université

Traduction de la sixième édition américaine de *An Introduction to Genetic Analysis*,
by Anthony J. F. Griffiths, Jeffrey H. Miller, David T. Suzuki, Richard C. Lewontin, William M. Gelbart

© 1996, 1993, 1989, 1986, 1981, 1976 by W.H. Freeman and Company, New York , New York and Oxford

ado
B. C. U. „M. EMINESCU" I. ȘI
BIOLOGIE
16.05.2016

© De Boeck Université s.a., 1997, pour la traduction et l'adaptation française
Paris.

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre, par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou microfilm, est strictement interdite.

Bibliothèque royale Albert Ier, Bruxelles: D/1997/0074/25
Bibliothèque Nationale, Paris: août 1997

ISBN 2-7445-0002-X

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La matière en un coup d'œil

1 La génétique et l'organisme 1

2 L'analyse mendélienne 21

3 La théorie chromosomique de l'hérédité 55

4 Les développements de l'analyse mendélienne 91

5 Liaison génétique (linkage) (I) : les bases de l'établissement de cartes chromosomiques chez les eucaryotes 123

6 Liaison génétique (linkage) (II) : techniques spéciales de cartographie des chromosomes eucaryotiques 155

7 Les mutations géniques 181

8 Les mutations chromosomiques (I) : altérations de la structure des chromosomes 211

9 Les mutations chromosomiques (II) : modifications du nombre de chromosomes 249

10 La recombinaison chez les bactéries et leurs virus 275

11 La structure de l'ADN 313

12 La nature du gène 341

13 La fonction de l'ADN 383

14 La technologie de l'ADN recombinant 423

15 Les applications de l'ADN recombinant 459

16 Structure et fonction des chromosomes eucaryotiques 493

17 La génomique 519

18 La régulation de l'expression des gènes 545

19 Les mécanismes du changement génétique (I) : mutations géniques 583

20 Les mécanismes du changement génétique (II) : la recombinaison 617

21 Les mécanismes du changement génétique (III) : les éléments génétiques transposables 637

22 Le génome extranucléaire 663

23 La régulation génétique au cours du développement 693

24 La génétique et la différenciation cellulaire 719

25 La génétique du développement : le devenir de la cellule et la formation des plans d'ébauche 747

26 Génétique des populations 779

27 Génétique quantitative 817

BOUVIA STATE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Table des matières

PRÉFACE

1 LA GÉNÉTIQUE ET L'ORGANISME 1

La génétique et les activités humaines 3
La génétique et la biologie 7
Les gènes et l'environnement 11
Les techniques de l'analyse génétique 17

2 L'ANALYSE MENDÉLIENNE 21

Les expériences de Mendel 22
Cas simples de génétique mendélienne chez l'Homme 32
Cas simples de génétique mendélienne en agriculture 37
Les variants et leur importance pour la dissection génétique 40

3 LA THÉORIE CHROMOSOMIQUE DE L'HÉRÉDITÉ 55

Mitose et méiose 56
La théorie chromosomique de l'hérédité 62
Chromosomes sexuels et liaison au sexe 70
Le comportement parallèle des gènes autosomiques et des chromosomes 76
Génétique mendélienne et cycles vitaux 76

4 LES DÉVELOPPEMENTS DE L'ANALYSE MENDÉLIENNE 91

Variations dans les rapports de la dominance 92
Les séries d'allèles multiples 93
Gènes létaux 95
Plusieurs gènes affectant le même caractère. Autres exemples d'interactions entre gènes 98
Pénétrance et expressivité 108

5 LIAISON GÉNÉTIQUE (LINKAGE) (I) : LES BASES DE L'ÉTABLISSEMENT DE CARTES CHROMOSOMIQUES CHEZ LES EUCARYOTES 123

La découverte de la liaison génétique 124
La recombinaison 126
Liaison génétique et symboles 127
Liaison des gènes sur le chromosome X 128
Cartes de liaison génétique 129
Croisements-tests impliquant trois gènes liés 131
Interférence 134
Le calcul des fréquences de recombinants à partir de dihybrides autofécondés 135
Exemples de cartes de liaison 135
Le test du $\chi 2$ 137
La nature du crossing-over 140
Etablissement chez l'homme d'une carte factorielle basée sur la recombinaison 142

6 LIAISON GÉNÉTIQUE (LINKAGE) (II) : TECHNIQUES SPÉCIALES DE CARTOGRAPHIE DES CHROMOSOMES EUCARYOTIQUES 155

Le calcul précis de grandes distances cartographiques 156
L'analyse de méioses individuelles 159
Ségrégation et recombinaison mitotiques 167

7 LES MUTATIONS GÉNIQUES 181

Les mutations somatiques et germinales 182
Les types de mutants 184
Comment se manifestent les mutations 187
Systèmes de sélection 191

BCU LAUSANNE CENTRALE UNIVERSITY LIBRARY

Induction de mutations 197
Mutations et cancer 199
Les mutagènes et l'analyse génétique 201
Utilisation des mutations pour l'élevage 203

8 LES MUTATIONS CHROMOSOMIQUES (I) : ALTÉRATIONS DE LA STRUCTURE DES CHROMOSOMES 211

La topographie des chromosomes 213
Types de réarrangements structuraux dans les chromosomes 216
Réarrangements chromosomiques au cours de l'évolution 234

9 LES MUTATIONS CHROMOSOMIQUES (II) : MODIFICATIONS DU NOMBRE DE CHROMOSOMES 249

Euploïdie anormale 250
Aneuploïdie 258
L'ingénierie chromosomique dans l'amélioration des plantes 266

10 LA RECOMBINAISON CHEZ LES BACTÉRIES ET LEURS VIRUS 275

La manipulation des microorganismes 276
La conjugaison bactérienne 277
La recombinaison chez les bactéries et la cartographie du chromosome d'*E. coli* 286
La transformation bactérienne 290
La génétique des bactériophages 291
La transduction 298
La cartographie des chromosomes bactériens 302
Le transfert génétique chez les bactéries – une synthèse 302

11 LA STRUCTURE DE L'ADN 313

L'ADN, matériel génétique 314
La structure de l'ADN 315
La réplication de l'ADN 321
Le mécanisme de réplication de l'ADN 326
La réplication de l'ADN chez les eucaryotes 332
L'ADN et le gène 334

12 LA NATURE DU GÈNE 341

Comment fonctionnent les gènes ? 342
Les relations gène - protéine 345
La structure fine du gène 358
Les sites mutationnels 364
La complémentation 369

13 LA FONCTION DE L'ADN 383

La transcription 384
La traduction 389
Le code génétique 392
La synthèse des protéines 399
L'universalité du transfert de l'information génétique 406
L'ARN eucaryotique 408
Le mécanisme d'excision - épissage des gènes 412
Revue 416

14 LA TECHNOLOGIE DE L'ADN RECOMBINANT 423

La préparation de l'ADN recombinant 424
Le clonage d'un gène spécifique 430
Le fractionnement de l'ADN par électrophorèse 442
La détermination de la séquence de l'ADN 444
La réaction de polymérisation en chaîne 448
Les cartes de restriction 449

15 LES APPLICATIONS DE L'ADN RECOMBINANT 459

La mutagénèse in vitro 460
La synthèse de gènes 462
L'expression de gènes eucaryotiques chez des bactéries 463
La génétique inverse 464
La technologie de l'ADN recombinant appliquée aux eucaryotes 465
La thérapie génique 478
L'ADN recombinant et le diagnostic des maladies génétiques 482

16 STRUCTURE ET FONCTION DES CHROMOSOMES EUCARYOTIQUES 493

La taille des génomes eucaryotiques 494
Un chromosome contient une seule molécule d'ADN 494
Le rôle des histones dans l'emmagasinage de l'ADN 497
Niveaux supérieurs d'enroulement 497
Hétérochromatine et euchromatine 500
Les bandes chromosomiques 501
L'ADN centromérique 502

BOSTON UNIVERSITY / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

L'organisation des séquences sur le chromosome 504
La réplication et la transcription de la chromatine 513

17 LA GÉNOMIQUE 519

L'assignation des loci à des chromosomes spécifiques 520
La cartographie des chromosomes 524
La cartographie physique des génomes 530
L'analyse génétique au moyen de cartes physiques 533
Le séquençage des génomes 536

18 LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES 545

Les circuits régulateurs de base 546
La découverte du système lac : un contrôle négatif 547
La répression catabolique de l'opéron *lac* : un contrôle positif 554
Un double contrôle positif et négatif : l'opéron arabinose 555
Les voies métaboliques 558
L'opéron tryptophane : un contrôle négatif doublé d'un mécanisme d'atténuation 559
Le phage λ : une association d'opérons 562
La répression d'opérons multiples 564
La structure des protéines régulatrices 564
La transcription : régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes - une vue d'ensemble 564
Le contrôle en cis de la transcription 566
Le contrôle en trans de la transcription 568
La régulation des facteurs de transcription 573
La régulation par méthylation 575
Les contrôles post-transcriptionnels 575
Le contrôle des molécules ubiquistes dans les cellules eucaryotiques 576

19 LES MÉCANISMES DU CHANGEMENT GÉNÉTIQUE (I) : MUTATIONS GÉNIQUES 583

La base moléculaire des mutations géniques 585
Les mutations spontanées 586
La mutagénèse induite 593
L'analyse par réversion 600
La relation entre agents mutagènes et carcinogènes 600
Les mécanismes biologiques de réparation 601
Déficiences des systèmes de réparation et maladies humaines 612

20 LES MÉCANISMES DU CHANGEMENT GÉNÉTIQUE (II) : LA RECOMBINAISON 617

La recombinaison générale homologue 618
Le modèle de Holliday 619
Les mécanismes enzymatiques de la recombinaison 626
La recombinaison spécifique de site 630
Recombinaison et remaniements chromosomiques 631
Duplications et évolution 631

21 LES MÉCANISMES DU CHANGEMENT GÉNÉTIQUE (III) : LES ÉLÉMENTS GÉNÉTIQUES TRANSPOSABLES 637

Les séquences d'insertion 638
Les transposons 640
Le phage Mu 644
Le mécanisme de la transposition 644
Réarrangements provoqués par les éléments transposables 646
Revue des transposons procaryotiques 648
Les éléments Ty de la levure 650
Les éléments transposables de la drosophile 650
Les rétrovirus 653
Transposition par l'intermédiaire d'un ARN 655
Les éléments de contrôle du maïs 656
Revue des transposons eucaryotiques 660

22 LE GÉNOME EXTRANUCLÉAIRE 663

L'hérédité extranucléaire chez les plantes supérieures 665
L'hérédité extranucléaire chez les champignons 666
Le sens de l'enroulement de la coquille chez les escargots : une fausse piste 668
Les gènes extranucléaires de Chlamydomonas 668
Les gènes mitochondriaux de la levure 672
Une vue d'ensemble du génome mitochondrial 676
Une vue d'ensemble du génome chloroplastique 678
Maladies mitochondriales chez l'Homme 680
Plasmides extragénomiques chez les eucaryotes 683
Combien d'exemplaires? 683

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE

23 LA RÉGULATION GÉNÉTIQUE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT 693

Régulation de la synthèse des protéines 694
Régulation de la spécificité tissulaire au niveau de la structure de l'ADN 694
Régulation de la transcription des gènes 695
Maturation des transcrits et régulation spécifique de tissus 696
Régulation post-transcriptionnelle 697
Régulation post-traductionnelle 698
Transmission héréditaire épigénétique 698
Dissection des éléments régulateurs eucaryotiques 700
Eléments régulateurs et mutations dominantes 703
Cascades régulatrices : implication de mécanismes de régulation dans les étapes décisives du développement 704
La détermination du sexe chez Drosophila 705
La détermination du sexe chez les mammifères 709
La voie de synthèse des anticorps : génération de leur diversité par remaniements de l'ADN 712

24 LA GÉNÉTIQUE DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE 719

Le cytosquelette et l'architecture cellulaire 720
Le cycle cellulaire 725
La communication intercellulaire 729
Le cancer : une maladie génétique des cellules somatiques 736

25 LA GÉNÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT : LE DEVENIR DE LA CELLULE ET LA FORMATION DES PLANS D'ÉBAUCHE 747

Formation des plans d'ébauche : l'établissement du plan de base du corps animal 748
Une brève introduction à la formation des plans d'ébauche 748
Étude du développement précoce 750
Un synopsis du développement précoce chez Drosophila 751
L'établissement de l'information positionnelle 754
Les morphogènes A/P 755
Le morphogène D/V 758
Établissement de la polarité dans l'ovocyte 760
La réponse initiale à l'information positionnelle 761
Affinement des décisions initiales du développement 762
Une cascade d'événements régulateurs 764
Détermination de l'identité des segments 766
Les mutations homéotiques et l'établissement de l'identité segmentaire 766
Application des leçons de la mouche à d'autres organismes : la génétique moléculaire de la souris 769

26 GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS 779

La révolution de Darwin 780
La variation et sa modulation 780
Les effets de la reproduction sexuée sur la variation 789
Les sources de la variation 791
La sélection 797
Le polymorphisme équilibré 802
Multiplicité des pics adaptatifs 804
La sélection artificielle 805
La variation due au hasard 807
Une synthèse des forces évolutives 808
L'origine des espèces 811

27 GÉNÉTIQUE QUANTITATIVE 817

Quelques notions de statistique 819
Génotypes et distribution des phénotypes 826
Normes de réaction et distribution phénotypique 828
L'héritabilité d'un caractère 830
Quantifier l'héritabilité 831
La détermination des normes de réaction 835
Détermination de la localisation des gènes 838
L'action des gènes 840
Analyse approfondie de la variance 842

RECOMMENDATIONS BIBLIOGRAPHIQUES 851

GLOSSAIRE 859

SOLUTIONS DE CERTAINS PROBLÈMES 880

INDEX 901

FOR STUDENT CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PRÉFACE

LES POINTS FORTS D'«*INTRODUCTION À L'ANALYSE GÉNÉTIQUE*».

La génétique est devenue une composante incontournable de presque toute recherche dans les domaines de la Biologie moderne et de la Médecine. Cette prépondérance résulte de la synthèse des approches classique et moléculaire. L'une et l'autre offrent une puissance d'analyse spécifique : la génétique classique n'a pas d'égale pour explorer des phénomènes biologiques encore mal connus, la génétique moléculaire est irremplaçable pour percer les secrets des mécanismes cellulaires. Il serait impensable d'enseigner l'une sans l'autre et chacune reçoit dans ce livre la place qui lui est due. Armé de ces deux approches, l'étudiant pourra se construire une vision intégrée des grands principes génétiques.

Une approche équilibrée

L'association de fait entre la génétique classique et la génétique moléculaire met l'enseignant devant un dilemme : quel aspect faut-il enseigner en premier? Nous pensons que l'étudiant doit commencer comme l'ont fait les biologistes du début du siècle, en posant des questions très générales sur les lois qui gouvernent l'hérédité. Par conséquent, la première moitié du livre présente la démarche intellectuelle qui a fondé la génétique eucaryotique classique, selon un schéma qui suit plus ou moins l'ordre historique. Bien que des informations d'ordre moléculaire soient fournies chaque fois qu'elles s'avèrent nécessaires, cet aspect de la génétique n'est pas développé dans la première partie. Une fois qu'il a acquis ce bagage classique, l'étudiant aborde la deuxième moitié du livre dans laquelle la génétique moléculaire s'articule sur l'échafaudage classique. La façon dont est traitée la mutation est un bon exemple. Dans le chapitre 7, l'étudiant découvre les principes des mutations géniques. Le chapitre 19 développe cette connaissance en l'étendant aux aspects moléculaires. Comme le passage du général au spécifique constitue une progression naturelle, cette méthode est la seule valable, non seulement en recherche, mais aussi pour enseigner comment se fait la recherche.

Figure 4-19

L'accent est mis sur l'analyse génétique

Fidèle à son titre, l'ouvrage traite d'analyse génétique. Ce thème répond à notre conviction que la meilleure façon de comprendre la génétique est d'apprendre comment s'établit le raisonnement génétique. Presqu'à chaque page, nous reconstituons les expériences-clés qui ont jalonné le développement de la génétique et nous mettons les étudiants en situation d'en analyser les résultats et d'en tirer les conclusions comme s'il s'agissait de leur propre recherche. Cette méthode proactive apprend aux étudiants à penser en scientifiques. Les modes d'inférence et les techniques d'analyse ouvrent la voie à de futures explorations.

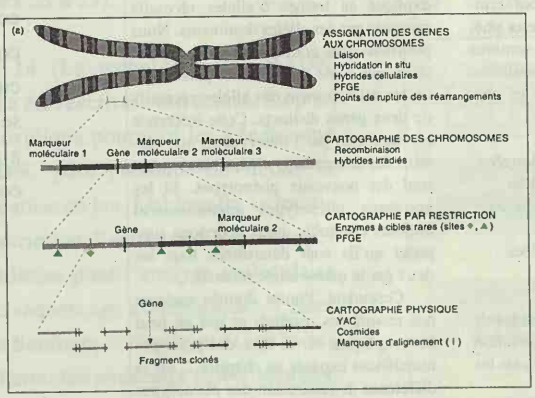


Figure 17-1

Dans le même esprit, une place importante est faite à l'analyse quantitative parce que beaucoup des idées nouvelles en génétique, depuis la formulation originale du concept de gène jusqu'aux techniques modernes comme la cartographie basée sur le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), sont basées sur une analyse quantitative. Les problèmes en fin de chapitre donnent aux étudiants l'occasion de tester leur compréhension de la matière en effectuant des analyses quantitatives qui simulent des problèmes réels.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Les outils pédagogiques

Les points forts des éditions précédentes sont conservés et d'autres s'y sont ajoutés.

CONCEPTS-CLÉS

- L'observation de rapports reproductibles dans la descendance de croisements entre variants héréditaires permet de conclure à l'existence des gènes.
- Une dissemblance de trait distinctif reflète souvent la modification d'un seul gène.
- Les organismes supérieurs possèdent deux exemplaires de chaque gène dans chacune de leurs cellules.
- Durant leur formation, les gamètes reçoivent chacun l'un des membres de chaque paire de gènes.
- Pendant la formation des gamètes, différents gènes se comportent souvent indépendamment les uns des autres.

Les **concepts - clés** énumérés au début de chaque chapitre donnent un aperçu des notions qui seront introduites et développées. Rédigées dans un language clair, dépourvu de terminologie génétique, ces rubriques servent de guide pédagogique au lecteur.

Des **messages encadrés** jalonnent le texte et permettent au lecteur de faire le point sur les matières qui viennent d'être traitées.

Message Dans les généalogies, c'est l'apparition d'un phénotype anormal chez les descendants masculins ou féminins d'individus non touchés qui révèle la transmission mendélienne d'une anomalie récessive.

RÉSUMÉ

La génétique moderne repose sur le concept de gène, l'unité fondamentale de l'hérédité. Par ses expériences sur le petit pois Mendel fut le premier à reconnaître l'existence des gènes. Par exemple, en croisant une lignée pure de plantes à fleurs pourpres avec une lignée pure de plantes à fleurs blanches, puis en laissant s'autoféconder la génération F_1, qui était entièrement pourpre, Mendel produisit une génération F_2 de plantes pourpres et blanches dans le rapport 3 : 1. Par des croisements du type plantes à pois jaunes avec plantes à

Dans les **résumés de chapitres**, la matière traitée est présentée de façon ramassée, avec un rappel des concepts abordés, ce qui est particulièrement utile lors des révisions préparant aux examens.

Une autre rubrique de fin de chapitre est le **diagramme conceptuel**, un outil pédagogique inspiré par le constructivisme éducatif qui affirme que l'apprentissage est le plus efficace quand les notions nouvelles sont confrontées directement aux concepts déjà acquis. Ce diagramme permet de visualiser et, si nécessaire, de résoudre des contradictions apparentes tout en facilitant l'assimilation conceptuelle.

Diagramme conceptuel

Tracer un schéma conceptuel reliant le plus grand nombre possible des termes suivants. Noter que ces termes sont mentionnés dans un ordre quelconque.

assortiment indépendant / génotype / phénotype / dihybride / croisement test / rapport 9 : 3 : 3 : 1 / autofécondation / gamètes / fécondation / rapport 1 : 1 : 1 : 1.

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Deux drosophiles à ailes normales (transparentes et allongées) sont croisées. La progéniture présente deux phénotypes nouveaux : des ailes sombres (d'aspect opaque) et des ailes «taillées» (aux extrémités droites). Voici les produits du croisement :

Femelles	179 transparentes, allongées
	58 transparentes, taillées
Mâles	92 transparentes, allongées
	89 sombres, allongées
	28 transparentes, taillées
	31 sombres, taillées

Donnez une explication génétique de ces résultats ainsi que la représentation des génotypes des parents et de toutes les classes de la descendance.

Solution

La première chose à faire est de relever tous les aspects intéressants des résultats. Le premier fait majeur est, bien sûr, l'apparition de deux phénotypes nouveaux. Nous avons déjà rencontré ce phénomène au chapitre 2 et nous l'avons expliqué en termes d'allèles récessifs masqués par des allèles dominants. Nous pourrions donc commencer par la supposition que l'une des mouches parentales, ou les deux, portent des allèles récessifs de deux gènes distincts. Cette inférence est confortée par l'observation que certains des descendants n'expriment qu'un seul des nouveaux phénotypes. Si les nouveaux phénotypes apparaissaient toujours ensemble, nous pourrions supposer qu'ils sont déterminés tous les deux par le même allèle récessif.

Cependant, l'autre donnée majeure qui ressort des résultats et qui ne peut être expliquée sur la base des principes mendéliens exposés au chapitre 2, est la différence de répartition des phénotypes entre les sexes. Bien qu'il y ait approximativement le même nombre de descendants mâles ou femelles, les mâles se répartissent en quatre classes phénotypiques, et les femelles en deux classes seulement. Ceci suggère immédiatement que nous ayons affaire à un cas d'hérédité liée au sexe. En nous penchant sur les

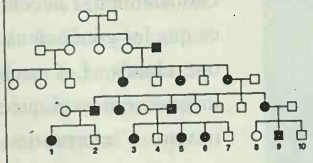
Les **problèmes de synthèse** sont des problèmes résolus qui intègrent les concepts du chapitre correspondant et les concepts introduits précédemment. Ces problèmes montrent comment une série de notions nouvellement acquises s'articule sur les acquis précédents. Ils permettent à l'étudiant de se construire une perspective globale de la génétique au fur et à mesure qu'il organise les concepts en un corpus cognitif cohérent.

BOU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Les problèmes de fin de chapitre sont précédés de quelques **problèmes résolus** qui montrent comment les généticiens appliquent les principes pour traiter les résultats expérimentaux. Ce qui va de soi pour les professionnels est souvent perçu comme un obstacle par les étudiants. Ces exemples pratiques préparent les étudiants à résoudre les problèmes par eux - mêmes.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. L'arbre généalogique que voici se rapporte à une maladie humaine rare.



a. Déduisez-en le mode probable de transmission héréditaire.

b. Quels seraient les résultats des mariages entre cousins 1 × 9, 1 × 4, 2 × 3 et 2 × 8?

Solution

a. Le mode de transmission le plus probable est la liaison à l'X d'un gène dominant. La dominance est révélée par le fait qu'après l'introduction de la maladie par le mâle à la génération II, chaque génération présente des individus ayant le phénotype malade. La liaison à l'X est révélée par l'absence de transmission du phénotype de père en fils. S'il s'agissait d'un gène autosomique dominant, la transmission d'un mâle à un autre serait courante. L'hypothèse d'un gène autosomique récessif est, en théorie, plausible, mais requiert trop de suppositions ad hoc. En particulier, voyez les mariages

Les **problèmes** restent un des points forts du livre. Ils sont présentés par ordre de difficulté croissante. Tous ont été soumis à des étudiants lors de séances d'exercices. La solution de certains d'entre eux se trouve à la fin de l'ouvrage. La série complète des réponses est publiée dans le *Student Companion* rédigé par Diane Lavett de l'Université Emory (Atlanta).

PROBLÈMES

3. Chez des levures haploïdes, on croise une souche pourpre (ad^-) de signe conjugant *a* et une souche blanche (ad^+) de signe conjugant α. Si ad^- et ad^+ constituent une paire de gènes et *a* et α une paire indépendante de la première, sur une autre paire de chromosomes, quelle descendance peut-on prévoir et dans quelles proportions?

4. Chez *Drosophila*, l'allèle récessif *s* détermine la formation d'ailes anormalement petites et l'allèle s^+ la formation d'ailes normales. On sait que ce gène est

LES NOUVEAUTÉS DE LA SIXIÈME ÉDITION

Révisions et mises à jour

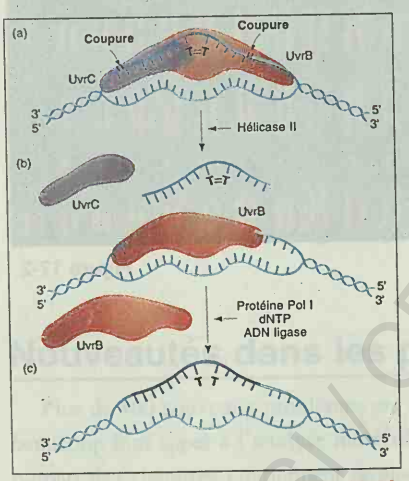


Figure 19-32

Tous les chapitres ont fait l'objet d'une révision et d'une mise à jour. Ils contiennent de nombreuses illustrations nouvelles. Les mises à jour les plus importantes concernent les chapitres consacrés aux techniques de génétique moléculaire (chapitres 14 à 17) et au domaine en pleine effervescence de la génétique du développement (chapitres 23 à 25).

Le **chapitre 14** (La technologie de l'ADN recombinant) a été réécrit et restructuré. La première partie explique pourquoi les généticiens clonent l'ADN, puis présente en détail la méthodologie mise en jeu. Le chapitre se termine avec la description d'autres techniques expérimentales utilisées pour l'analyse moléculaire : le séquençage de l'ADN (avec une section consacrée au séquençage automatique), l'électrophorèse de l'ADN (avec l'analyse par transferts de type Southern et Northern et les cartes de restriction) et la réaction de polymérisation en chaîne. Parmi les nouveaux sujets abordés, il faut mentionner les plasmides pUC, le clonage par complémentation, le clonage par positionnement, le clonage par étiquetage de gènes, la préparation d'oligonucléotides dont la séquence se base sur une séquence de protéine, et l'analyse d'ORF. La section consacrée à la construction et l'utilisation de banques d'ADN a été augmentée.

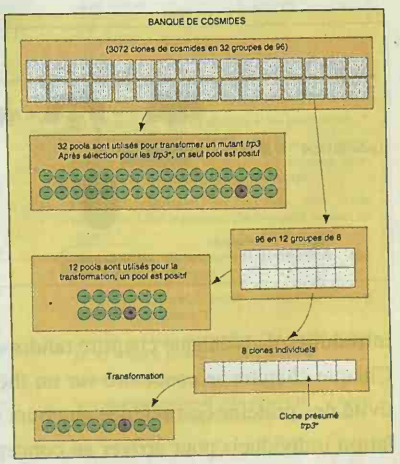


Figure 14-15

BIBLIOTECA CENTRAL UNEXPO

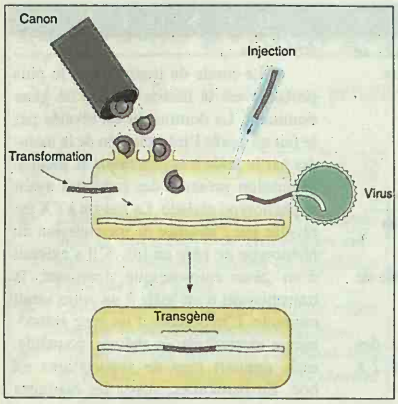


Figure 15-14

Le **chapitre 15** (Les applications de l'ADN recombinant) a été considérablement révisé. Globalement, l'accent y est mis d'avantage sur ce que les généticiens font avec les gènes qu'ils ont clonés. Les techniques de la génétique inverse sont expliquées, comme la mutagénèse in vitro, l'interruption de gènes et le remplacement de gènes. Le chapitre comporte une nouvelle section sur la thérapie génique.

Dans le **chapitre 16** (La structure et la fonction des chromosomes eucaryotiques), la description de l'ADN répétitif a été mise à jour pour adapter la terminologie à celle utilisée dans le chapitre 17, par exemple en ce qui concerne l'ADN mini- et microsatellite.

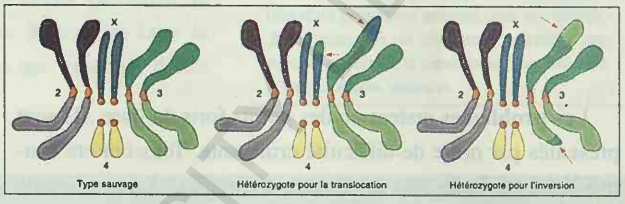


Figure 16-2

Le **chapitre 17** est consacré à la Génomique, l'étude de génomes entiers. Sa présence reflète l'importance de la recherche dans ce domaine et l'intérêt du public pour le projet de séquençage du génome humain. Le chapitre rassemble les techniques traditionnelles d'analyse des génomes telles que la cartographie par recombinaison et l'hybridation de cellules somatiques, et les nouvelles méthodes développées spécialement pour manipuler les grandes quantités d'ADN présentes dans les chromosomes eucaryotiques. De nouvelles sections sont consacrées à l'hybridation in situ avec des sondes fluorescentes, à l'électrophorèse en champs alternés, à la cartographie par polymorphisme des fragments de restriction (RFLP) et par polymorphisme de longueur de séquences simples (SSLP), à l'analyse génotypique du sperme, à l'amplification aléatoire d'ADN polymorphes (RAPD), au transfert de gènes fusionnés après irradiation (IFGT), aux contigs, aux sites marqués par des séquences, au tri de chromosomes (FACS), à l'identification de gènes candidats responsables de maladies génétiques et à la cartographie physique du chromosome Y humain.

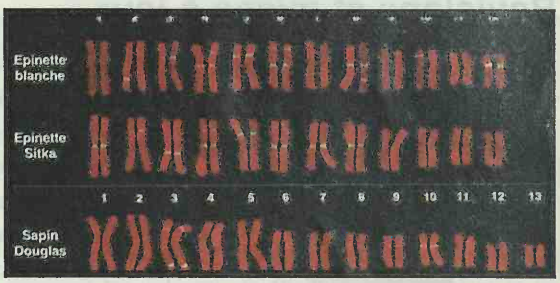


Figure 17-2.

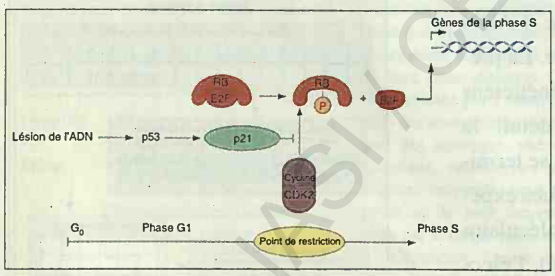


Figure 24-11

Les **chapitres 23** à **25** constituent une révision majeure des chapitres 22 et 23 de la cinquième édition, de façon à rendre compte des développements récents dans le domaine en perpétuelle effervescence de la génétique du développement. De nouvelles sections ont été introduites dans chaque chapitre tandis que d'autres ont été supprimées pour leur faire place. Chaque chapitre se concentre sur un thème majeur. Le **chapitre 23** explique comment l'activité des protéines est régulée au cours du développement en partant d'événements de régulation individuels pour arriver au concept de voies de développement. Parmi les nouveautés de ce chapitre, l'étudiant trouvera une discussion des phénomènes épigénétiques qui aborde la paramutation chez les plantes et l'empreinte parentale chez les mammifères.

MCGILL UNIVERSITY LIBRARY

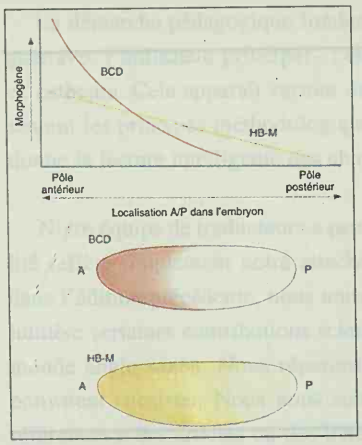
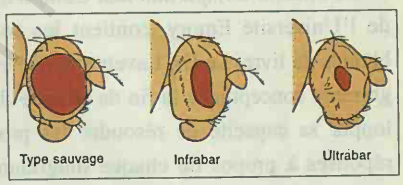


Figure 25-10

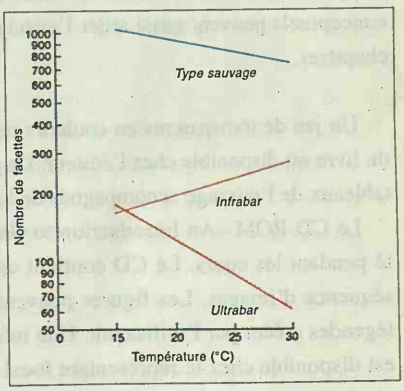
Les dernières années ont vu s'effacer la séparation entre la biologie cellulaire et la biologie du développement. Le **chapitre 24** s'attache à le montrer en présentant plusieurs domaines de la biologie cellulaire qui ont un impact immédiat sur la génétique du développement. Les nouveaux sujets comprennent le cytosquelette et la forme de la cellule, le cycle cellulaire et la communication entre cellules. Le chapitre se termine par une discussion sur la génétique du cancer qui réunit beaucoup des concepts et principes abordés dans les chapitres 23 et 24.

Le chapitre 25 est focalisé sur la formation des schémas biologiques complexes. Le mécanisme extrêmement subtil du développement précoce de la Drosophile est pris comme exemple de la manière dont les généticiens s'attaquent à une des questions principales de la biologie du développement. L'accent est mis particulièrement sur la façon dont l'information spatiale est incorporée et déchiffrée dans l'ovocyte en cours de développement et dans le jeune embryon. Le chapitre se termine par un aperçu de la génétique du développement des mammifères et par l'idée qui se fait jour que les mécanismes de segmentation et de positionnement spatial sont très anciens et hautement conservés dans tout le règne animal.

(a)



(b)



(C)

Figure 1-17

Chapitre 26. La génétique des populations précède le chapitre consacré à la génétique quantitative (chapitre 27), ce qui constitue une inversion par rapport aux éditions précédentes. De nombreux utilisateurs de l'ouvrage nous ont fait remarquer que l'étudiant aborde plus facilement la génétique quantitative s'il s'est frotté d'abord à la génétique des populations. De plus, la génétique quantitative moderne est issue de la théorie de la génétique des populations. Nous avons ajouté une section consacrée à la localisation des loci des caractères quantitatifs (QTL) par les nouvelles méthodes de génétique moléculaire, un sujet qui suscite un intérêt considérable, tant en génétique humaine qu'en agronomie.

Nouveautés dans les problèmes

Plus de 100 nouveaux problèmes ont été ajoutés, dont beaucoup font appel à l'analyse moléculaire. De plus, la plupart des chapitres contiennent un nouvel exercice de résolution de problèmes appelé «Décomposons le problème». Cet exercice a été introduit pour illustrer l'idée qu'un problème de génétique ne met directement en jeu que la pointe d'un énorme iceberg de connaissances. (Nous pensions même appeler ces problèmes spéciaux des «problèmes-icebergs»). Ce n'est que lorsque la structure des niveaux de connaissance sous-jacents est bien comprise qu'un problème peut être résolu de façon constructive. Les exercices de décomposition renvoient à ces niveaux de connaissance sous-jacents. Certaines des questions peuvent paraître triviales, mais elles abordent des points qui, souvent mal compris, empêchent alors l'étudiant de résoudre correctement les problèmes.

Décomposons le problème

a. Qu'est-ce que l'ADNmt ?
b. Représentez une molécule d'ADNmt en y indiquant au moins cinq gènes propres à l'ADNmt.
c. Qu'est-ce qu'une petite cytoplasmique ?
d. Quelle est la nature d'une petite cytoplasmique au niveau de l'ADN ?
e. Pourquoi représenter l'ADN d'une petite par un arc de cercle ?
f. Expliquez succinctement comment vous pourriez déterminer ce qu'il reste d'ADN dans une petite en effectuant une analyse par enzymes de restriction.
g. Qu'est-ce qu'un mutant *mir* ? Qu'est-ce qu'un tel mutant par rapport à une petite ? Faites le schéma d'un mutant *mir* d'une petite et d'une grande.
h. Les mutants *mir* sont-ils résistant à des antibiotiques ?
i. Qu'est-ce qu'un cytohet ? Donnez-en un autre exemple. Donnez un synonyme de cytohet ou inventez vous-même un terme qui corresponde au concept.
j. Comment construire les cytohets dans cette expérience ? Des marqueurs d'auxotrophie seraient-ils utiles ?
k. Dans quel sens utilise-t'on le terme «fusionné» dans l'énoncé de la question ?
l. Comment les cellules de levure se comportent-elles sur le milieu de croissance ?
m. Dessinez une boîte représentative d'un résultat désigné par un + dans le tableau.
n. Faites de même pour un – .
o. Que signifient exactement ici les signes + et – ? La complémentation ou la recombinaison est-elle impliquée ?

PUBLICATIONS DE L'UNIVERSITÉ

Organisation d'un cours

Le texte dans son entièreté est adapté à un cours donné sur deux semestres, qui couvre tous les aspects de la génétique contemporaine. Le plan d'un cours d'un seul semestre peut se baser sur des chapitres choisis. Pour des étudiants déjà familiarisés avec la structure et la fonction de l'ADN, une sélection pour un cours d'un semestre pourrait comprendre les chapitres 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 16, 23 et 25. Un cours d'un semestre de génétique moléculaire pourrait être basé sur les chapitres 10 à 25.

Accessoires pédagogiques

Le *Student Companion and Complete Solutions*, écrit par Diane K. Lavett de l'Université Emory, contient les solutions raisonnées de tous les problèmes du livre. Le Dr. Lavett a révisé et étendu la section consacrée au diagramme conceptuel à la fin de chaque chapitre, pour aider l'étudiant à développer sa capacité de résoudre les problèmes. Une série de questions et réponses à propos de chaque diagramme permet à l'étudiant de tester sa compréhension des connexions entre les concepts-clés. Les diagrammes conceptuels peuvent aussi aider l'enseignant à structurer la présentation des chapitres.

Figure 1-5

Un jeu de transparents en couleurs reprenant 130 illustrations importantes du livre est disponible chez l'éditeur. De plus, les quelque 1100 illustrations et tableaux de l'ouvrage accompagnés de leurs légendes existent en CD-ROM.

Le CD-ROM «An Introduction to Genetic Analysis» peut être vu sur ordinateur et projeté pendant les cours. Le CD contient un logiciel spécial qui permet de présélectionner une séquence d'images. Les figures peuvent être montrées avec ou sans légendes, ou avec des légendes créées par l'utilisateur. Une information complète sur ces accessoires pédagogiques est disponible chez le représentant local de Freeman.

Préface des traducteurs

En préface à la première édition française (1991) de «An Introduction to Genetic Analysis», nous écrivions : «...il était devenu évident que l'étudiant francophone ne disposait pas dans sa langue maternelle d'un ouvrage qui non seulement couvre l'ensemble de la génétique moderne sans sacrifier un seul de ses nombreux aspects, mais restitue aussi la génèse des découvertes avec une conscience et un bonheur aussi grands....S'il fallait choisir un livre à traduire, il était naturel que le choix se porte sur celui-ci.» A quelque six ans de distance, cette appréciation vaut aussi pour la sixième édition anglophone de l'ouvrage. Les quatre traducteurs responsables de cette deuxième édition française ont suivi l'évolution du livre à travers les 5è et 6è éditions anglophones qui se sont succédées très rapidement . La cinquième édition a vu l'introduction de la couleur qui ajoute encore à l'impact des images souvent fort belles, mais c'est dans la sixième que les progrès considérables de la génétique, dus à la révolution de l'ADN recombinant, se retrouvent sous forme de chapitres nouveaux ou complètement révisés. L'étude de génomes entiers - la génomique - et la génétique du développement reçoivent l'attention que mérite leur place à la pointe de la recherche génétique.

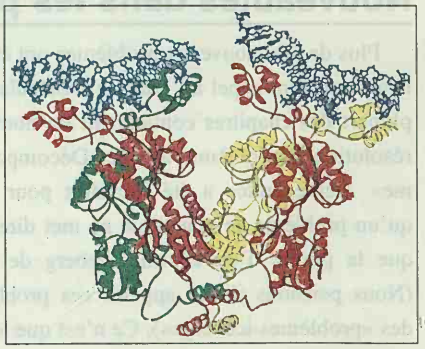


Figure 18-33

BCU LAUSANNE CENTRALE LIBRARY

La démarche pédagogique fondamentale est restée la même : les auteurs préfèrent dialoguer avec l'utilisateur principal - l'étudiant - plutôt que de lui communiquer une information ex cathedra. Cela apparaît surtout dans les chapitres de génétique plus «classique» qui présentent les principes méthodologiques essentiels de la génétique, dont l'assimilation conditionne la lecture intelligente des chapitres «moléculaires».

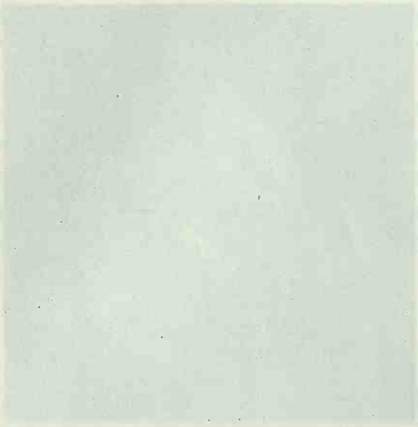
Notre équipe de traducteurs a peu changé depuis la première édition française. Cette fidélité reflète simplement notre attachement à ce livre comme ouvrage de référence. Comme dans l'édition précédente, nous nous sommes permis, lorsque c'était opportun, de mettre en lumière certaines contributions scientifiques importantes de chercheurs n'appartenant pas au monde anglo-saxon. Nous réparons ainsi certaines omissions qui, sans être délibérées, ne pouvaient subsister. Nous nous sommes efforcés d'introduire, quand c'était possible, des références à des articles ou des livres en français et nous avons essayé de trouver la traduction la plus adéquate de certains néologismes anglo-saxons. Cependant, la majeure partie de la littérature originale est en anglais. Nous encourageons l'étudiant à approfondir sa connaissance en lisant les publications originales. La sélection présentée à la fin du livre ne comprend que des articles essentiels dont beaucoup sont des grands classiques de l'analyse génétique, rédigés avec une rigueur et un souci de clarté qui s'accordent bien avec l'esprit du présent ouvrage. Leur découverte, en s'aidant du livre, peut être une source de plaisir véritable.

Illustration d'ouverture du chapitre 24

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY

Les traducteurs tiennent à remercier Jacques Béchet pour avoir bien voulu se charger au pied levé de la traduction du chapitre 25. Ils remercient MM. Michel Jezierski, Directeur Editorial et Michel Blaimont, Responsable de Production, des Editions De Boeck-Université pour une collaboration agréable.

Jacques Béchet, Nicolas Glansdorff et Michel Jacobs remercient Mmes Jo Calcoen, Lucy Marteau et Jacqueline Wijns pour la préparation de leurs manuscrits.

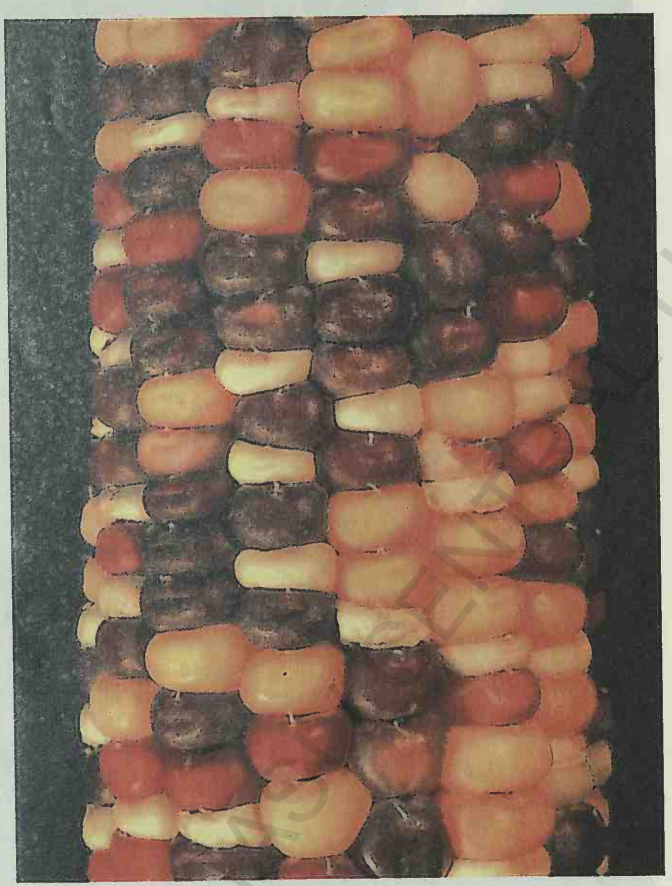


BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

1

La génétique et l'organisme



CONCEPTS-CLÉS

- La génétique unifie les sciences biologiques.
- La génétique intéresse directement les activités humaines.
- La génétique peut être définie comme l'étude des gènes à travers leurs variations.
- La variation génétique contribue aux variations de la nature.
- Au cours de son développement, l'ensemble unique des gènes d'un organisme interagit avec son environnement tout aussi unique pour déterminer ses caractéristiques.

Variation génétique de la couleur des graines de maïs. Chaque grain représente un individu séparé présentant une constitution génétique distincte. La photographie symbolise l'histoire de l'intérêt du genre humain pour l'hérédité. L'homme améliorait déjà le maïs des milliers d'années avant l'avènement de la discipline moderne que représente la génétique. En continuation de cet héritage, le maïs est aujourd'hui un des principaux organismes étudiés en génétique classique et en génétique moléculaire. (William Sheridan, Université du Dakota du Nord ; photo de Travis Amos)

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

Pourquoi s'intéresser à la génétique ? Pour deux raisons. La première, c'est que la génétique est devenue une plaque tournante de la biologie et que comprendre la génétique est capital pour tous ceux qui désirent étudier à fond la vie des plantes, des animaux ou des microorganismes. La seconde, c'est que la génétique, plus que toute autre discipline scientifique, occupe aujourd'hui une position centrale dans divers secteurs des activités humaines et, à ce titre, concerne le genre humain sous divers aspects. En effet, des questions liées à la génétique se posent quotidiennement et il n'est plus possible à quelqu'un de conscient d'en ignorer les découvertes. Ce chapitre présente un panorama de la science de la génétique et montre comment elle est arrivée à occuper cette position essentielle. Nous y exposons en outre la manière d'aborder les chapitres suivants.

Commençons par définir la génétique. Certains la présentent comme l'étude de l'hérédité mais les phénomènes héréditaires ont intéressé l'homme longtemps avant la naissance de notre civilisation. Bien avant que la biologie ou la génétique ne constituent les disciplines scientifiques que nous connaissons aujourd'hui, les peuples anciens amélioraient déjà les plantes cultivées et les animaux domestiques en sélectionnant des individus qu'ils réservaient à la reproduction. Ils ont certainement été intrigués par la transmission des caractères chez l'homme et se sont demandé pourquoi les enfants ressemblent à leurs parents ou comment certaines maladies se transmettent dans les familles. Mais ces gens ne pouvaient être considérés comme des généticiens. La génétique en tant qu'ensemble de principes et de méthodes analytiques ne débuta pas avant les années 1860 lorsqu'un moine augustinien nommé Gregor Mendel (figure 1-1) réalisa une série d'expériences qui mirent en évidence des éléments biologiques appelés **gènes**. Le mot «génétique» vient de «gènes» et les gènes constituent l'objet principal de cette discipline. Que les généticiens mènent leurs études au niveau de la molécule, de la cellule, de l'organisme, de la population ou encore de l'évolution, les gènes sont toujours au centre de leurs préoccupations. En termes simples, la génétique est la science des gènes.

Qu'est-ce qu'un gène? C'est un segment d'une molécule filiforme, l'**acide désoxyribonucléique,** dont le nom est abrégé en **ADN**. L'ADN, le matériel héréditaire qui est transmis d'une génération à une autre, détermine les propriétés intrinsèques des espèces. Chacune des cellules d'un organisme contient un ou deux exemplaires d'un complément fondamental d'ADN appelé un **génome**. Le génome à son tour comporte une ou plusieurs molécules d'ADN extrêmement longues qu'on appelle des **chromosomes**. Les gènes sont les régions fonctionnelles des chromosomes

Figure 1-1. Gregor Mendel. (Musée Morave, Brno)

et sont simplement des segments actifs placés les uns derrière les autres le long de ces chromosomes (figure 1-2). Chez les organismes les plus complexes, le nombre de chromosomes est généralement de l'ordre de la dizaine tandis que le nombre de gènes est de l'ordre de plusieurs dizaines de milliers. Nantis de ces définitions de la génétique et des gènes, voyons maintenant pourquoi la compréhension de ces notions a pris une telle importance. Nous envisagerons d'abord l'impact de la génétique sur notre propre espèce.

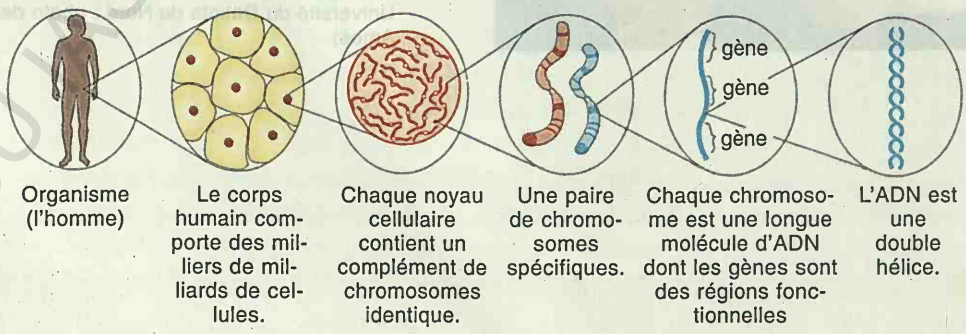


Figure 1-2. Agrandissements successifs d'un organisme dans le but de focaliser l'attention sur le matériel génétique.

La génétique et les activités humaines

La génétique occupe une place toute spéciale dans les activités humaines. Elle n'est pas seulement importante dans le sens où les autres disciplines scientifiques le sont, mais elle l'est aussi parce qu'elle nous apprend énormément de choses sur la nature du genre humain. Elle occupe à ce titre une position prédominante parmi les sciences biologiques.

La société moderne a besoin de la génétique. Jetez un coup d'œil aux vêtements que vous portez. Le coton de votre chemise et de votre pantalon provient de cotonniers qui sont différents de leurs ancêtres sauvages parce qu'ils résultent de programmes d'amélioration intensive basés sur l'application systématique des principes de la génétique. Il en est de même des moutons qui ont produit la laine de votre chandail et de votre veston. Songez aussi à vos récents repas. Vous pouvez être certain que le riz, le blé, le poulet, le bœuf ou le porc qui y figuraient ont été, comme tous les organismes qui servent à alimenter les habitants de cette planète, façonnés tout spécialement en appliquant des procédés génétiques courants (figure 1-3). La «Révolution verte», qui a si spectaculairement accru la productivité globale des plantes cultivées, est un succès de l'élaboration par la génétique de lignées hautement productives de certaines espèces importantes (figure 1-4).

Pour obtenir une production agricole maximum, un fermier peut semer des graines de la même constitution génétique sur une vaste superficie ; c'est la pratique de la monoculture. Puisque des organismes pathogènes ou des prédateurs s'attaquent aux cultures, des gènes de résistance sont introduits par croisement dans les lignées cultivées. Mais cette protection n'est que temporaire: Des modifications génétiques aléatoires se produisent en permanence parmi les populations d'organismes pathogènes et peuvent parfois leur conférer des aptitudes pathogènes nouvelles. Ces modifications mettent en péril la monoculture tout entière. C'est pourquoi les généticiens des plantes doivent toujours avoir une longueur d'avance sur les pathogènes pour éviter les épidémies et leurs conséquences catastrophiques pour la production des produits alimentaires (tableau 1-1 et figure 1-5).

Les champignons et les bactéries ont aussi été améliorés pour les besoins de l'homme. Les levures en sont un exemple manifeste ; elles sont à la base d'industries plusieurs fois milliardaires en dollars qui fabriquent des produits de boulangerie, des boissons alcoolisées ou de l'alcool carburant. Les champignons produisent la pénicilline, un antibiotique, ou la cyclosporine, un immunosuppresseur qui évite le rejet des greffes d'organes, ainsi que toute une gamme de produits organiques importants comme l'acide citrique et d'enzymes comme l'amylase. Les bactéries fournissent d'autres antibiotiques importants pour les sciences médicales comme la streptomycine. La plupart des industries qui utilisent les champignons et les bactéries ont bénéficié de l'application des principes de la génétique classique, mais nous entrons aujourd'hui dans une ère nouvelle où les scientifiques, grâce aux techniques de la génétique moléculaire, peuvent créer des souches microbiennes entièrement nouvelles qui sont construites en tube à essai sur base des

Figure 1-3. Un généticien réalisant un croisement contrôlé chez le maïs. Des sacs en papier servent à éviter les pollinisations accidentelles et à récolter le pollen qui servira aux croisements spécifiques désirés. (Chuck O'Rear / Woodfin Camp)

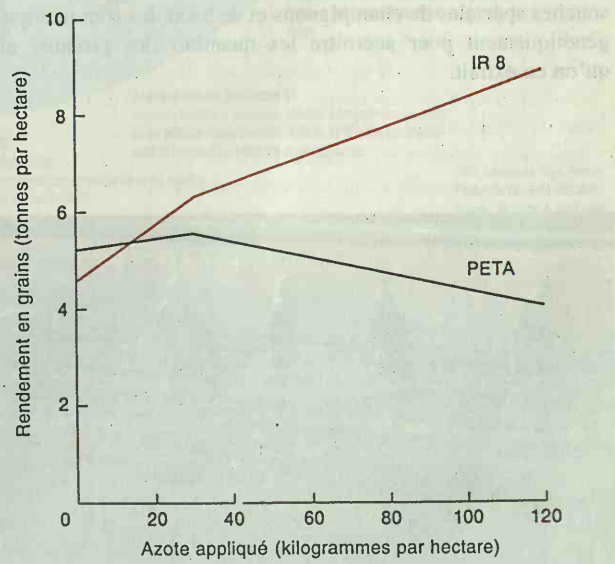


Figure 1-4. La souche spéciale de riz nain appelée IR8 doit en partie son succès à sa remarquable réponse à l'application d'engrais. PETA, une souche plus ancienne de taille normale, montre une réponse plus typique. (De Peter R. Jennings,«The Amplification of Agricultural Production.» *Scientific American,* Septembre 1976, pages 180 à 194.)

Tableau 1-1. Souches de riz résistantes aux pestes.

Souches	Année de développement	Maladies					Insectes		
		Pyricularia oryzae	Feu bactérien	Virus «Leaf-streak»	Virus «Grassy stunt»	Virus «Tungro»	*Nephopettix sp.*	*Nitaparvata lugens*	Mineuse de la tige
IR8	1966	MR	S	S	S	S	R	S	MS
IR5	1967	S	S	MS	S	S	R	S	S
IR20	1969	MR	R	MR	S	R	R	S	MS
IR22	1969	S	R	MS	S	S	S	S	S
IR24	1971	S	S	MR	S	MR	R	S	S
IR26	1973	MR	R	MR	MR	R	R	R	MR

NOTE : Les entrées décrivent la sensibilité de chaque souche ou la résistance à chaque peste de la manière suivante : S = sensible ; MS = modérément sensible ; MR = modérément résistant ; R = résistant. (De *Research Highlights*, International Rice Research Institution, 1973, p.11).

besoins spécifiques de l'homme. C'est de cette manière, par exemple, qu'on a obtenu des souches bactériennes productrices de protéines de mammifères comme l'insuline qui est utilisée pour le traitement du diabète ou l'hormone de croissance qui sert à soigner le nanisme hypophysaire. L'insuline produite par le génie génétique est la véritable hormone humaine contrairement à celles qu'on utilisait antérieurement, qui étaient d'origine bovine ou porcine. Certaines substances obtenues par génie génétique sont extrêmement difficiles à produire à partir d'autres sources : par exemple, la quantité d'hormone de croissance requise pour le traitement d'un enfant pendant un an exigeait auparavant l'extraction des hypophyses de 75 cadavres humains. De plus, certaines souches spéciales de champignons et de bactéries sont manipulées génétiquement pour accroître les quantités des produits utiles qu'on en extrait.

Figure 1-5. Lignées pures de différentes espèces de riz sélectionnées pour leur résistance à divers parasites des végétaux (Patrick Aventurier / Gamma Liaison.)

Le génie génétique moléculaire fut appliqué en premier lieu aux microbes mais à l'heure actuelle les mêmes techniques sont appliquées aux plantes et aux animaux et fournissent des lignées manipulées qui n'auraient jamais pu être obtenues par la génétique classique. Cette approche consiste à modifier le génome d'une plante ou d'un animal par l'exposition des cellules à des fragments d'ADN «étranger» porteurs de gènes issus d'une autre espèce. Cet ADN est absorbé et inséré dans un ou plusieurs chromosomes du récepteur, et peut dès lors être transmis comme n'importe quelle portion du génome. Les cellules modifiées de la sorte sont dites **transgéniques**. A partir d'une cellule transgénique, ont peut obtenir un organisme transgénique dont toutes les cellules contiennent cet ADN étranger supplémentaire. Un large éventail de plantes et d'animaux commercialement intéressants peut ainsi être créé. L'application du génie génétique est généralement appelée la **biotechnologie**. On considère que l'industrie biotechnologique basée sur la génétique deviendra au cours de la prochaine décennie l'une des industries les plus rentables financièrement. Que ceci se vérifie ou non, l'industrie biotechnologique contribue déjà à procurer au genre humain son haut niveau de vie actuel.

Un autre secteur des activités humaines qui fait appel à la génétique est celui de la médecine légale. Tous les êtres humains possèdent plus ou moins le même assortiment d'ADN. Mais des variations mineures de cet ADN sont responsables des variations humaines. Cette variation peut être visualisée grâce à un test moléculaire simple qui fournit une «empreinte digitale» (fingerprint) hautement individualisée. De telles empreintes digitales peuvent être obtenues à partir de très petits échantillons de sang ou de sperme, ou même à partir de follicules capillaires. Les empreintes digitales d'ADN sont largement utilisées dans les enquêtes policières. Même des empreintes d'ADN végétal peuvent être utiles. Ainsi, on a rapporté un cas où l'ADN de deux minuscules graines trouvées à l'arrière d'un camion suspect ont permis d'établir très clairement que celui-ci avait été garé sous un arbre à proximité duquel le corps de la victime d'un meurtre avait été retrouvé.

La génétique intervient de manière essentielle en médecine. La mauvaise santé chez l'homme a dans une large mesure une origine génétique. On estime, par exemple, qu'au moins 30 pour cent des

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

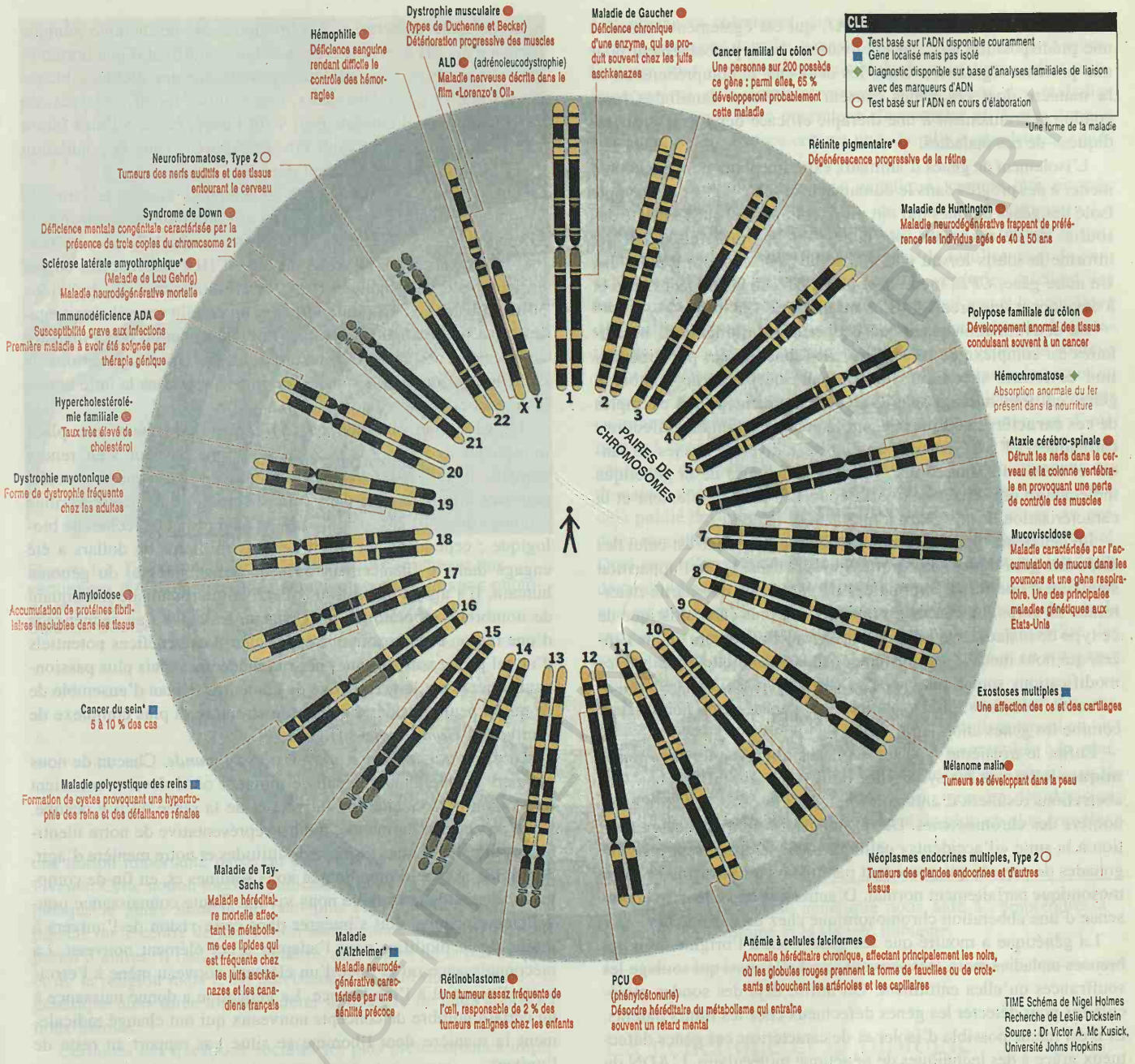


Figure 1-6. Les 23 chromosomes humains avec les positions des gènes dont les formes anormales sont les causes des maladies héréditaires les plus connues.(*Time*)

admissions en hôpital psychiatrique impliquent une composante génétique. Mais les recherches actuelles montrent de plus en plus l'importance des prédispositions d'origine génétique dans des maladies graves aussi bien que dans des affections plus bénignes, de telle sorte que ces chiffres sont presque certainement sous-estimés.

Les affections d'origine génétique appartiennent à trois types principaux. Le premier concerne des **maladies génétiques héréditaires** qui résultent de la transmission de gènes anormaux d'une génération à la suivante. Beaucoup de maladies génétiques héréditaires (comme la mucoviscidose—*cystic fibrosis* en anglais—, la phénylcétonurie et la dystrophie musculaire) résultent d'effets majeurs liés à la présence d'une forme anormale d'un gène unique. Les positions sur les cartes des chromosomes humains des gènes uniques dont les formes anormales sont responsables des maladies héréditaires les plus connues sont indiquées dans la figure 1-6. Nous vivons une époque passionnante où beaucoup de gènes uniques responsables de telles maladies peuvent être isolés et caractérisés au niveau moléculaire. Des exemples récents sont ceux des gènes responsables des formes familiales de la maladie d'Alzheimer et du cancer du sein. Le gène *S182* localisé sur le chromosome 14 est responsable de 80 pour cent des maladies d'Alzheimer familiales précoces et de 10 pour cent de tous les cas de cette maladie. Il code pour une protéine membranaire. Les formes familiales de cancer du sein représentent 5 pour cent de tous les cancers du sein dans notre population. Des formes anormales des gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont les causes des deux tiers

de ces maladies familiales. *BRCA1*, qui est également associé à une prédisposition aux cancers ovariens, code probablement pour une protéine régulatrice. Dans les deux cas, la compréhension de la manière dont ces gènes causent ces formes familiales rares conduira certainement à une thérapie efficace des formes «sporadiques» de ces maladies.

L'isolement de gènes d'animaux expérimentaux peut également mener à des progrès dans le domaine de la santé. On a par exemple isolé des gènes uniques qui ont un effet important sur l'obésité des souris. Un de ces gènes, *ob*, code pour une protéine signal qui informe la souris lorsqu'elle a absorbé suffisamment d'aliments. Un autre gène, *CPE*, incite la souris à devenir lentement obèse et à développer une prédisposition au diabète.

La détermination génétique de beaucoup d'affections héréditaires est complexe en ce sens qu'elles sont causées par l'interaction de formes spécifiques de plusieurs ou même de nombreux gènes qui tous interagissent avec l'environnement. Des exemples de ces **caractères complexes** sont la prédisposition aux affections cardiaques, à l'hypertension, au diabète, à diverses formes de cancer et même aux infections. Mais les techniques de la génétique moléculaire ont ouvert des voies nouvelles pour l'isolement et la caractérisation de ces gènes à interactions multiples.

Le deuxième type de maladies d'origine génétique est celui des **maladies génétiques somatiques** qui sont causées par l'apparition soudaine d'une forme anormale d'un gène dans une partie déterminée du corps. Le cancer est l'exemple le plus caractéristique de ce type de maladie. On ne se rend pas toujours compte que le cancer, qui nous menace tous, est une maladie génétique. Même si les modifications somatiques ne sont pas transmises à la génération suivante, certaines prédispositions au cancer sont héréditaires comme les gènes anormaux.

Enfin, le troisième type est celui des **aberrations chromosomiques** telles que les syndromes de Down et du cri du chat. Ces aberrations résultent d'anomalies héréditaires de la structure et du nombre des chromosomes. Des cas apparaissent à chaque génération à la suite «d'accidents» cellulaires qui se produisent dans les gonades de parents qui possèdent par ailleurs un assortiment chromosomique parfaitement normal. D'autres cas découlent de la présence d'une abberation chromosomique chez un des parents.

La génétique a montré que les gènes sont à l'origine de nombreuses maladies mais, très souvent, c'est elle aussi qui soulage les souffrances qu'elles entraînent. On utilise déjà des sondes moléculaires pour détecter les gènes défectueux chez les futurs parents. Et il est même possible d'isoler et de caractériser ces gènes défectueux grâce à des techniques de génétique moléculaire. L'ADN du gène qui cause la mucoviscidose a été isolé et caractérisé récemment. Sur la base de la structure moléculaire de ce gène, les chercheurs peuvent maintenant étudier le défaut physiologique qui provoque la maladie. Une fois que la nature de la maladie sera connue, il sera possible de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Et, en fin de compte, on peut espérer que la thérapie génique guérira de nombreuses maladies génétiques. La thérapie génique consiste à insérer la copie normale d'un gène dans des cellules qui contiennent son homologue défectueux, de manière à ce que la fonction normale du gène inséré compense la fonction anormale du gène défectueux. Les premiers cas de thérapie génique humaine décrits concernent deux enfants souffrant d'une immunodéficience sévère, une affection héréditaire des globules blancs causée par un gène défectueux. Des cellules furent prélevées, un gène fonctionnant correctement y fut inséré, et les cellules furent réinjectées aux enfants pour être incorporées dans la population des globules blancs proliférant dans leur organisme.

Les généticiens s'appliquent également à étudier le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) qui provoque le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Au cours de leur cycle normal de reproduction, les virus du type d'HIV insèrent des copies de leur matériel génétique dans les chromosomes des individus qu'ils infectent. C'est pourquoi, dans un certain sens, il s'agit également d'une maladie génétique. La détermination de la manière dont ces gènes viraux s'intègrent et deviennent fonctionnels constitue par conséquent une étape importante dans la lutte contre les maladies causées par ces virus.

La génétique humaine occupe incontestablement une place importante dans les activités de l'homme et, pour s'en rendre compte, il suffit de voir les sommes d'argent que la société consacre à la recherche dans cette discipline. La société attribue rarement des milliards de dollars à un seul projet de recherche biologique ; cependant, un crédit de trois milliards de dollars a été engagé dans le financement du séquençage intégral du génome humain. Il s'agit d'une action collective internationale impliquant de nombreux laboratoires dont chacun travaillera au séquençage d'une région chromosomique spécifique. Les bénéfices potentiels d'un tel projet sont énormes pour la médecine. Mais plus passionnante encore est la perspective de connaître le plan d'ensemble de ce qu'on peut considérer comme la structure la plus complexe de l'univers, l'*Homo sapiens* (figure 1-7).

La génétique influence notre vision du monde. Chacun de nous acquiert graduellement depuis le moment où il devient conscient une vision personnelle de l'univers et de la place qu'il y occupe. Cette perception du monde, qui est représentative de notre identité individuelle et nous inspire nos attitudes et notre manière d'agir, détermine le type d'homme que nous sommes et, en fin de compte, la société dans laquelle nous vivons. Toute connaissance nouvellement acquise doit s'intégrer dans cette vision de l'univers à moins de la modifier pour l'adapter à cet élément nouveau. La méconnaissance ou le rejet d'un élément nouveau mène à l'étroitesse d'esprit et à l'intolérance. La génétique a donné naissance à un certain nombre de concepts nouveaux qui ont changé radicalement la manière dont l'homme se situe par rapport au reste de l'univers.

Le meilleur exemple de changement de la vision du monde est probablement fourni par les travaux de génétique, de cytogénétique et de biologie moléculaire qui montrent que nous les hommes sommes parents non seulement des singes et des autres mammifères mais aussi, ce qui est plus inattendu, de *tous* les êtres vivants de la planète, y compris les plantes, les champignons et les bactéries. Tous les êtres vivants possèdent le même système de stockage et d'expression de l'information génétique et présentent de nombreuses analogies de structure même dans leurs gènes. Le fait qu'il existe un spectre de parenté continu dans le monde vivant est

Figure 1-7. Deux généticiennes moléculaires analysant des séquences d'ADN. Les bandes sombres sont des images photographiques de segments d'ADN radioactif. (David Parker / Science Source / Photo Researchers)

une notion importante parce qu'elle nous intègre aux autres êtres vivants. Cette notion modifie radicalement notre vision du monde puisque le genre humain ne peut plus être considéré comme le pinacle ou le centre de la création mais comme une forme vivante parmi d'autres. Il faut le reconnaître, ceci relève de la philosophie et de la religion mais c'est précisément le fond du problème : la génétique nous force à reconsidérer la manière de nous apprécier nous-mêmes.

Certaines des questions sociales les plus préoccupantes impliquent une composante génétique indirecte. Les problèmes d'injustice et de préjugés sociaux les plus graves sont liés à des différences de comportement entre les races et entre les sexes. La génétique fournit le moyen d'analyser et de réfléchir à ces questions complexes qui attendent encore une solution.

Une des préoccupations essentielles des biologistes est la vitesse alarmante de destruction des habitats naturels, en particulier sous les tropiques, qui abritent de vastes réservoirs de vie animale et végétale. Ici également, le problème possède une composante génétique essentielle puisque la question est de préserver la diversité des ressources génétiques. L'évaluation de l'impact global de la destruction des habitats naturels exige de comprendre la génétique.

Un autre domaine où la génétique peut entraîner des retombées importantes sur le plan général est celui de la santé génétique de nos populations. De nombreux généticiens se préoccupent du fait que le génome humain est exposé aux agressions d'un nombre croissant d'agents écologiques, principalement des radiations et des substances chimiques, susceptibles de provoquer des modifications aléatoires dans les gènes. La grande majorité de ces modifications sont probablement nuisibles. A court terme, elles n'influenceraient pas significativement la fréquence des maladies héréditaires mais elles pourraient s'accumuler et, à plus longue échéance, refaire surface comme une «bombe à retardement génétique».

Evidemment, la technologie génétique, comme tout progrès technologique, apporte sa part de problèmes éthiques. La «Révolution verte», par exemple, est un succès en termes de productivité mais les concentrations élevées de fertiliseurs et de pesticides exigées par les nouvelles variétés végétales suscitent des inquiétudes en ce qui concerne la pollution de l'eau et le coût élevé des fertiliseurs pour les agriculteurs des régions pauvres. La création de formes vivantes nouvelles par le génie génétique soulève maintes objections quant au dessein du genre humain de «jouer au dieu» ou en ce qui concerne la validité morale et légale de brevets couvrant la création de variétés nouvelles de plantes ou d'animaux. L'accès aux informations qui concernent la constitution génétique des individus peut également être un problème dans des domaines comme l'assurance maladie ou la médecine légale. On a déjà publié des preuves crédibles de l'existence de gènes qui prédisposeraient à des comportements agressifs ou à l'homosexualité. Quel serait l'impact de la connaissance de ces gènes sur les droits des individus qui en sont porteurs ? Il serait fort désinvolte de dire que ce n'est pas le problème des scientifiques mais celui de la société ; les scientifiques doivent partager la responsabilité des conséquences de leurs découvertes pour la société et en envisager toutes les retombées avant de les publier.

Les exemples cités ci-dessus montrent que la plupart des problèmes auxquels nous sommes confrontés quotidiennement en tant qu'individus ou en tant que société sont intimement liés à la génétique. Ce n'est que par la compréhension des aspects génétiques de ces problèmes que nous pouvons espérer prendre des décisions adéquates en ce qui concerne le monde de plus en plus complexe et instable auquel nous appartenons.

Message L'approche génétique nous aide à comprendre la nature de l'homme et la société humaine.

La génétique et la biologie

La biologie est un domaine immense. La planète Terre abrite un nombre stupéfiant de formes vivantes. On connaît déjà, par exemple, 286.000 espèces de plantes à fleurs, 500.000 espèces de champignons et 750.000 espèces d'insectes. Et un plus grand nombre d'espèces reste encore à découvrir. Il y a cinquante ans, la biologie était scindée en disciplines distinctes dont chacune étudiait la vie à un niveau différent. On distinguait la morphologie, la physiologie, la biochimie, la taxonomie, l'écologie, la génétique, etc., qui se cantonnaient dans des compartiments pratiquement isolés. Or les découvertes de la génétique ont fourni des thèmes unificateurs à toute la biologie, de telle sorte qu'aujourd'hui un réseau conceptuel unique rassemble toutes ces disciplines.

Le principal lien thématique est en réalité un fil, la molécule d'ADN. Nous savons aujourd'hui que l'ADN est à la base de tous les processus et structures des êtres vivants. La structure de la molécule d'ADN rend compte de deux des caractéristiques majeures de la vie, la réplication et la genèse de la forme. Nous

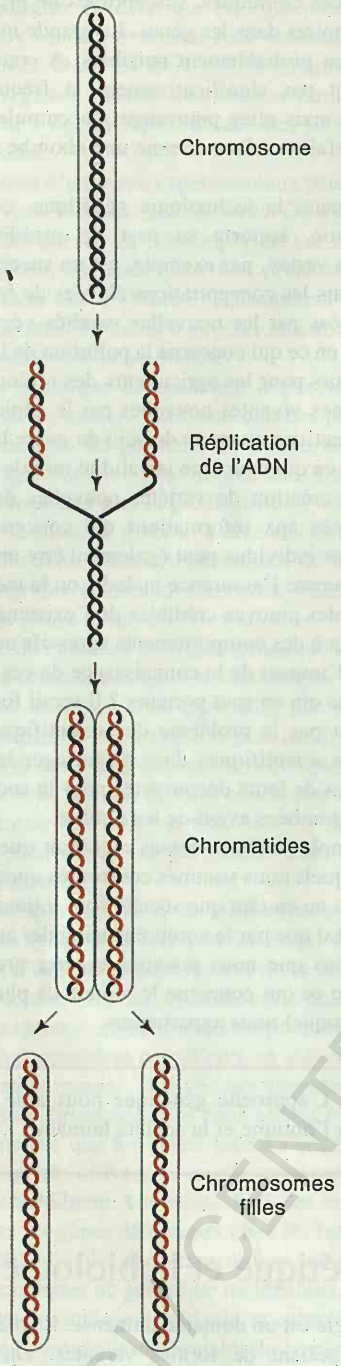


Figure 1-8. Lorsque de nouvelles cellules se forment, la réplication de l'ADN permet à un chromosome de se transformer en une paire de chromatides qui deviennent ensuite des chromosomes et sont transmis aux nouvelles cellules.

verrons que l'ADN est une structure en double hélice douée de la propriété intrinsèque de pouvoir réaliser ses propres copies. Ces copies sont effectuées avant la division cellulaire, ce qui permet aux chromosomes de se diviser en **chromatides** qui deviennent ensuite les chromosomes qui seront transmis aux cellules filles. Ce processus de réplication et de formation de chromatides est essentiellement similaire pour la division des cellules sexuelles et non sexuelles ; il est schématisé dans la figure 1-8. (Notons cependant que les deux types de division cellulaire présentent de nombreuses différences que nous passerons en revue dans des chapitres ultérieurs.). C'est ce processus de réplication de l'ADN qui permet d'effectuer des copies des cellules et des organismes et de les perpétuer (figure 1-9). L'ADN peut donc être considéré comme le fil qui nous rattache à nos ancêtres dans l'évolution. En outre se trouve inscrit dans la séquence linéaire des blocs de construction de la molécule d'ADN un code qui contient les instructions nécessaires à l'élaboration d'un organisme ; nous pouvons considérer ceci comme de l'information ou comme «ce qui est nécessaire pour conférer la forme». Les traits particuliers d'une espèce, qu'il s'agisse de sa structure ou de ses processus physiologiques, sont influencés par son ADN. Dès lors, sous-jacent aux structures observées par les morphologistes, aux réactions étudiées par les physiologistes, ou aux analogies constatées par les évolutionnistes, nous percevons le fil unificateur de la molécule d'ADN.

L'ADN agit pratiquement de la même manière chez tous les organismes. En soi, ceci est un autre thème unificateur qui signifie que ce qui est acquis pour un organisme est souvent applicable à d'autres. C'est pour cette raison que la génétique a souvent fait un usage intensif d'organismes modèles dont beaucoup seront évoqués dans la suite de cet ouvrage. En réalité, le développement de la génétique humaine au cours de la dernière décennie fut dans une large mesure possible grâce aux progrès réalisés dans l'étude de modestes organismes comme les bactéries et les champignons.

La génétique a également conduit à des méthodes analytiques de pointe qui sont actuellement utilisées dans tout l'éventail des disciplines biologiques. Au tout premier rang, nous trouvons la **dissection génétique**, une approche expérimentale qui permet de démonter ou, en d'autres mots, de «disséquer» n'importe quelle structure, ou n'importe quel processus, en identifiant les gènes qui les influencent. Ainsi, dans l'étude du développement, chacun des gènes anormaux qui conduit à une anomalie sur le plan du développement permet d'identifier une étape de ce processus. Un tableau d'ensemble peut ensuite être dressé par l'assemblage des étapes contrôlées génétiquement qui ont été identifiées. Un autre succès est l'utilisation de gènes spécifiques comme **marqueurs**. De même qu'on utilise des étiquettes de couleurs vives pour identifier certains animaux ou certaines plantes au cours d'expériences biologiques, les généticiens se servent de gènes mutés pour suivre la trace de chromosomes, de cellules ou d'individus spécifiques. Cette technique a trouvé des applications dans toute la gamme des disciplines biologiques, de la biologie cellulaire à l'évolution et à l'écologie. Des gènes impliqués dans des maladies de l'homme sont, par exemple, isolés grâce à leur proximité avec des séquences sans aucune relation avec ces maladies.

Nous avons vu que l'ingénierie génétique moléculaire a ouvert de nouvelles perspectives en biotechnologie mais les mêmes techniques se sont montrées tout aussi utiles en recherche fondamentale. Grâce à la possibilité de transférer des gènes d'un organisme à un autre, les chercheurs ont pu construire des plantes qui brillent parce qu'elles expriment les gènes de phosphorescence des lucioles ou conservent leur dureté au froid parce qu'elles expriment des gènes antigel de poisson, ou encore des souris géantes parce qu'elles expriment les gènes des hormones de croissance du rat. Ils ont aussi manipulé des gènes de levure pour produire des chromosomes entièrement artificiels mais fonctionnels. La faculté d'isoler un gène en tube à essai, de modifier spécifiquement sa structure et de le réinsérer ensuite dans l'organisme de départ a

BCU LAUSANNE CENTRAL

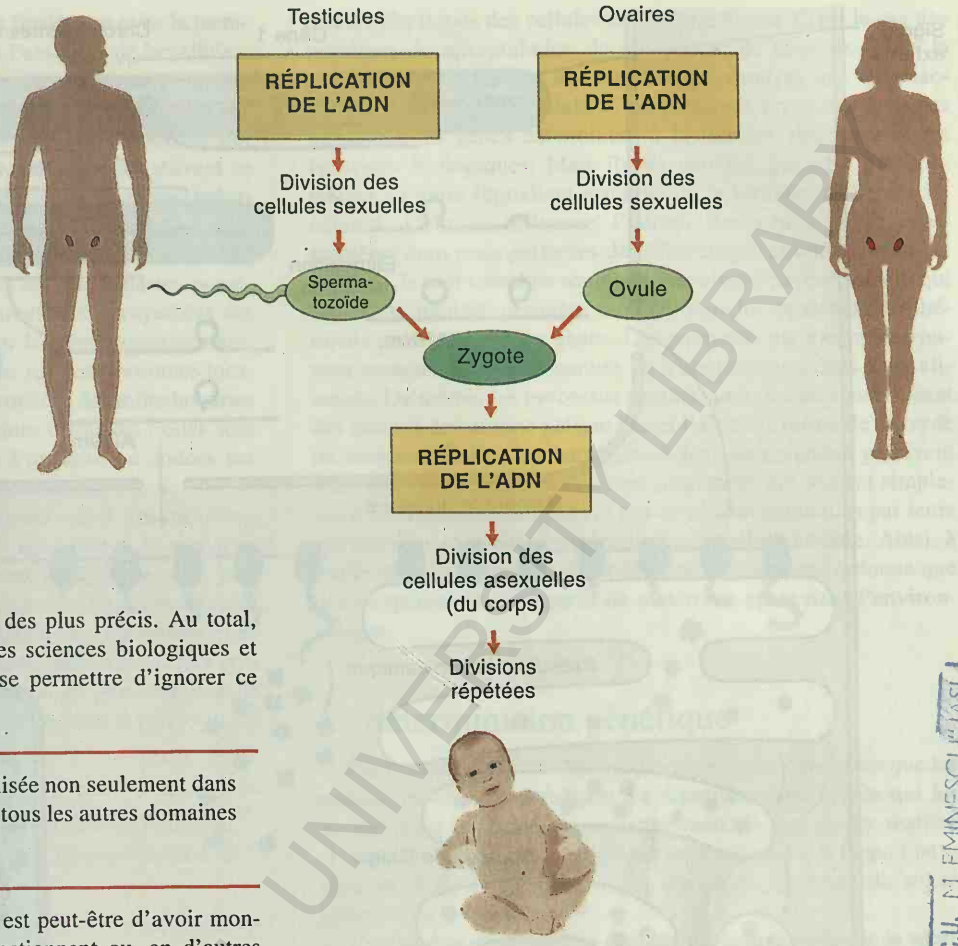


Figure 1-9. La réplication de l'ADN est la base de la perpétuation de la vie au cours du temps.

doté la dissection génétique d'un outil des plus précis. Au total, l'ingénierie génétique a révolutionné les sciences biologiques et aucun biologiste aujourd'hui ne peut se permettre d'ignorer ce puissant outil analytique.

Message L'analyse génétique est utilisée non seulement dans l'étude de l'hérédité mais aussi dans tous les autres domaines de la biologie.

Le plus grand succès de la biologie est peut-être d'avoir montré exactement comment les gènes fonctionnent ou, en d'autres termes, comment l'information devient forme. C'est une histoire merveilleuse qui s'est développée avec une étonnante rapidité au cours de la carrière de chercheurs qui n'ont encore qu'une cinquantaine d'années aujourd'hui et n'ont jamais, même dans leurs rêves les plus fous, imaginé que dans les années 1990 les généticiens parviendraient à séquencer des génomes entiers. Or, aujourd'hui, le stockage et le flux de l'information génétique dans les cellules sont le fondement de la pensée génétique moderne et le point de départ de toute démarche expérimentale. Il vaut la peine de rappeler comment circule l'information génétique ou, ce qui revient au même, comment agissent les gènes, c'est-à-dire ce qu'on a appelé le *nouveau paradigme de la biologie*. La figure 1-10 schématise l'action des gènes dans une cellule **eucaryote** généralisée. Les eucaryotes sont des organismes dont les cellules possèdent un noyau entouré d'une membrane. Les animaux, les plantes et les champignons sont tous des eucaryotes. A l'intérieur du noyau se trouvent les chromosomes tandis qu'à l'extérieur de celui-ci s'étend un réseau complexe de structures membranaires, dont notamment le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, ainsi que des organites comme les mitochondries et les chloroplastes.

Dans ce noyau eucaryotique, certains gènes sont constamment actifs tandis que d'autres sont mis en route et arrêtés en fonction des besoins de la cellule ou de l'organisme. Le signal qui rend un gène actif peut venir de l'extérieur ; c'est le cas par exemple de substances comme les hormones stéroïdes. Mais ce signal peut aussi venir de l'intérieur même de la cellule lorsqu'intervient un gène régulateur spécial dont la fonction est de mettre en route ou d'arrêter le fonctionnement d'autres gènes. Des substances régulatrices se lient à une région particulière du gène et provoquent la synthèse de copies de celui-ci. Ces copies se présentent sous la forme d'une molécule appelée l'ARN. Les régions non-codantes du gène, appelées **introns**, sont éliminées à ce stade et ce qui reste de la séquence du gène est l'**ARN messager** ou **ARNm**. Les molécules d'ARNm passent par les pores nucléaires et aboutissent dans le cytoplasme où l'information contenue dans leurs séquences est traduite en protéines. Chaque gène code pour une protéine distincte qui remplit une fonction spécifique dans la cellule (c'est le cas par exemple de la protéine vert foncé de la figure 1-10) ou dans d'autres parties de l'organisme en cas d'exportation (la protéine rose). Les protéines sont les déterminants principaux de la morphologie des organismes vivants : chaque fois qu'on regarde un organisme, ce qu'on voit ce sont des protéines ou des matériaux qui ont été synthétisés par des protéines.

La synthèse des protéines destinées à l'exportation (protéines sécrétées) a lieu à la surface du réticulum endoplasmique rugueux, un ensemble de vésicules aplaties garnies vers l'extérieur de ribosomes, les agents de la synthèse protéique. L' ARNm passe à travers les ribosomes qui catalysent l'assemblage d'un chapelet d'acides aminés qui constitueront la protéine. Chaque acide aminé est acheminé vers le ribosome par une molécule d'**ARN de transfert (ARNt)** spécifique qui se fixe à une unité codante, également spécifique, de l'ARNm.

Les ARNt sont synthétisés à partir de gènes spéciaux. Ils ne

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI BIOLOGIE

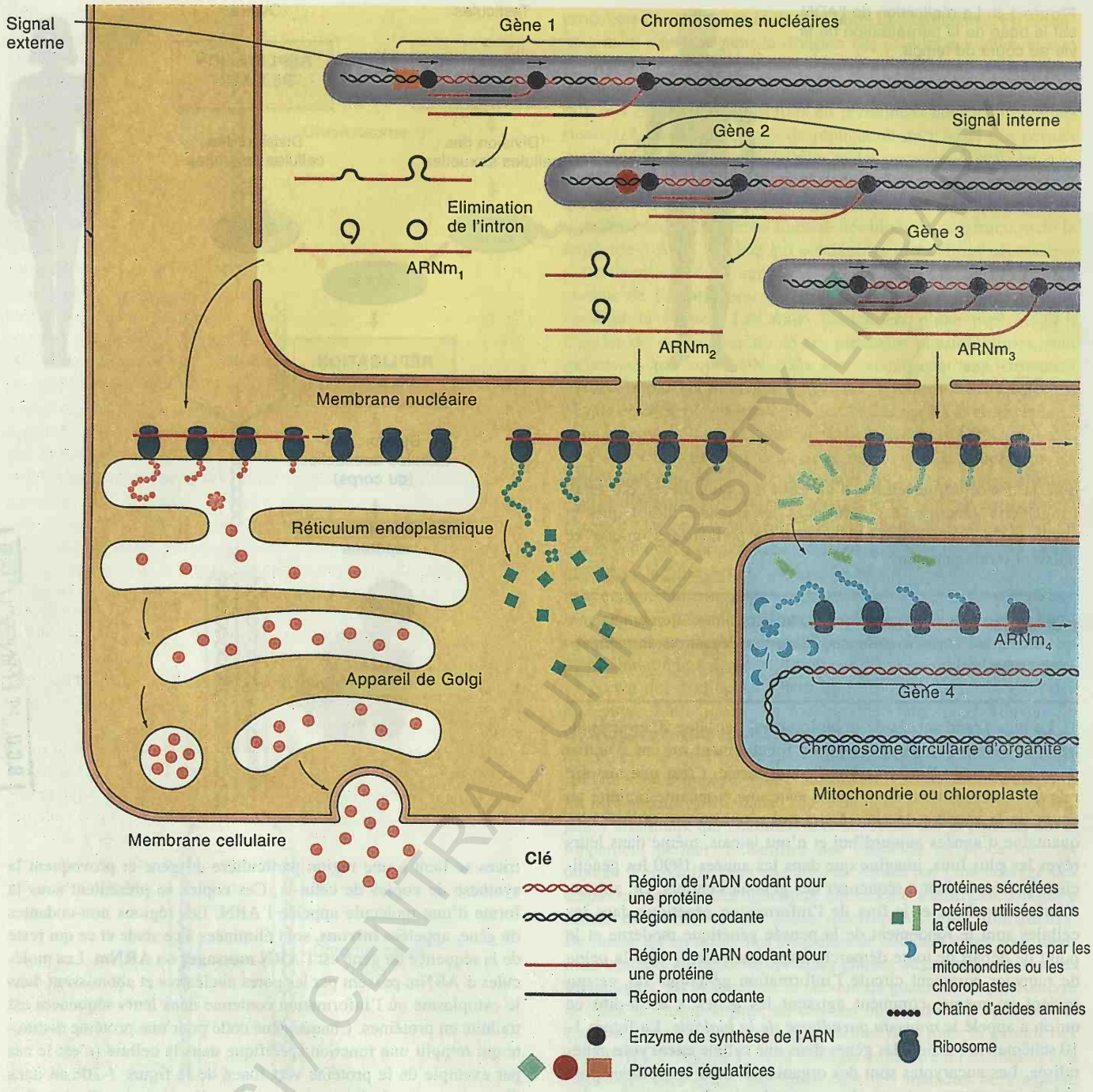


Figure 1-10. Vue simplifiée de l'action d'un gène dans une cellule eucaryotique. Le flux de l'information génétique est en principe dirigé de l'ADN vers l'ARN et ensuite vers les protéines. On montre quatre types de gènes. Le gène 1 réagit à des signaux régulateurs externes et est responsable de la synthèse d'une protéine destinée à être exportée ; le gène 2 répond à des signaux internes et conduit à la synthèse d'une protéine qui sera utilisée dans le cytoplasme ; le gène 3 mène à la synthèse d'une protéine qui sera transférée dans un organite ; enfin le gène 4 fait partie de l'ADN d'un organite et assure la production d'une protéine destinée à cet organite. La plupart des gènes eucaryotiques comportent des introns, c'est-à-dire des régions (en général non codantes) qui sont excisées lors de l'élaboration d'un ARN messager fonctionnel. Il est à noter que beaucoup de gènes d'organites contiennent des introns et qu'une enzyme de synthèse des ARN est nécessaire pour la synthèse des ARNm d'organites. Pour la clarté, ces détails ont été omis du schéma de l'organite. (Les introns seront décrits en détails dans des chapitres ultérieurs.)

sont pas traduits en protéines et sont constamment recyclés après avoir livré leurs acides aminés spécifiques aux ribosomes. Le ribosome lui-même est constitué d'un ensemble complexe de protéines et de plusieurs ARN appelés des **ARN ribosomiques (ARNr)**. Les gènes d'ARNr sont groupés dans une région chromosomique spéciale appelée l'**organisateur nucléolaire.** Comme les ARNt, les ARNr ne sont jamais traduits en protéines.

Les chaînes d'acides aminés terminées sont insérées dans la lumière du réticulum endoplasmique où elles se replient spontanément pour acquérir leur conformation de protéine. Les protéines, qui à ce stade subissent parfois des modifications, sont alors introduites dans les citernes de l'appareil de Golgi et ensuite dans les

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

vésicules sécrétrices. Celles-ci fusionnent finalement avec la membrane cellulaire et libèrent leur contenu à l'extérieur de la cellule.

Les protéines destinées à fonctionner dans le cytoplasme ou dans les mitochondries et les chloroplastes sont synthétisées sur des ribosomes qui ne sont pas liés aux membranes. Celles qui jouent le rôle d'enzymes de la glycolyse, par exemple, suivent ce trajet. La synthèse de toutes les protéines utilise le même mécanisme avec les mêmes types d' ARNt mais les protéines destinées aux organites sont étiquetées spécialement en vue de leur ciblage dans ces organites. Les mitochondries et les chloroplastes possèdent leurs propres petits chromosomes circulaires. La synthèse des protéines codées par des gènes situés sur les chromosomes mitochondriaux ou chloroplastiques s'effectue sur des ribosomes localisés à l'intérieur de ces organites. Les protéines des mitochondries et des chloroplastes ont donc deux origines distinctes : elles sont codées par le noyau et importées dans l'organite ou codées par l'organite et synthétisées dans celui-ci.

Les cellules des **procaryotes**, notamment celles des bactéries, ont une structure plus simple ; elles ne contiennent ni noyau ni autre structure entourée d'une membrane. La synthèse des protéines y est dans ses grandes lignes analogue à celle des eucaryotes et utilise également des ARNm, des ARNt, des ribosomes et le code génétique mais présente d'importantes différences. Les procaryotes n'ont, par exemple, pas d'introns et ne possèdent pas de compartiments entourés de membranes où passent les ARN et les protéines.

Message Le flux de l'information de l'ADN vers l'ARN et, ensuite, vers les protéines est devenu un principe central de la biologie

Les gènes et l'environnement

Le résultat net de l'action d'un gène est la formation d'un produit protéique qui peut avoir deux fonctions selon le gène. Il peut s'agir d'une **protéine de structure** qui intervient dans les propriétés physiques des cellules et de l'organisme. C'est le cas des protéines de microtubules, de muscles et de cheveux. Mais la protéine peut aussi être une **enzyme** qui catalyse une des réactions chimiques de la cellule. C'est pourquoi, en codant pour des protéines, les gènes déterminent à la fois les structures et les fonctions biologiques. Mais ils ne peuvent pas agir par eux-mêmes ; l'autre ingrédient essentiel de la formule est l'environnement. Celui-ci influence l'action des gènes de diverses manières dont nous parlerons dans des chapitres ultérieurs de cet ouvrage. Il faut toutefois souligner que c'est l'environnement qui fournit la matière première requise pour les processus synthétiques contrôlés par les gènes. Les animaux, par exemple, trouvent certains des acides aminés de leurs protéines dans leurs aliments. De même, les processus synthétiques des plantes utilisent des atomes de carbone présents dans l'air sous forme de dioxyde de carbone. Enfin, les bactéries et les champignons prélèvent dans leur environnement diverses substances qui servent simplement de squelettes carbonés et azotés et sont converties par leurs enzymes en composés constitutifs de la cellule vivante. Ainsi, à l'aide des gènes, un organisme élabore ce processus ordonné que nous appelons la vie à partir de matériaux épars dans l'environnement.

La détermination génétique

Par ce coup d'œil sur l'action des gènes nous constatons que les organismes vivants mobilisent les constituants du monde qui les entoure pour les convertir en composants de leur propre matière vivante. Un gland devient un chêne en n'utilisant que l'eau, l'oxygène, le dioxyde de carbone, les composés minéraux du sol et l'énergie de la lumière.

Un gland se développe en formant un chêne tandis que la spore d'une mousse donne une autre mousse ; pourtant, ils vivent côte à côte dans la même forêt (figure 1-11). Les deux plantes qui résultent de ce processus de développement ressemblent à leurs parents et diffèrent l'une de l'autre ; pourtant, elles ont accès à la même gamme réduite de substances inorganiques présentes dans leur environnement. Les parents transmettent à leur descendance les

Figure 1-11. Les gènes d'une mousse orientent les constituants de l'environnement vers la formation d'une mousse, tandis que les gènes d'un arbre dirigent les mêmes substances vers l'élaboration d'un arbre. (André Bärtschi)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITARA

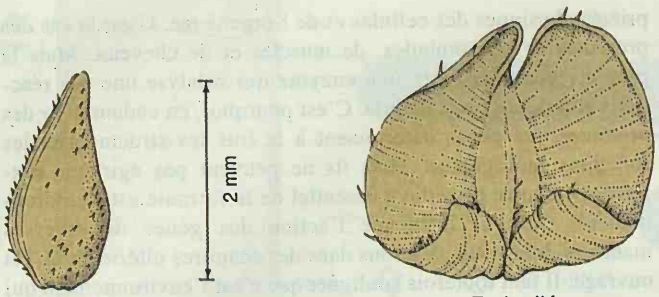


Figure 1-12. Les fruits de deux formes différentes de *Plectritis congesta*. Une plante donnée produit soit uniquement des fruits ailés, soit uniquement des fruits sans ailes. Pour le reste, ces plantes sont parfaitement identiques. Cette différence frappante dans l'aspect des fruits est déterminée par une différence génétique simple.

spécifications qui correspondent à l'élaboration de leurs cellules à partir des matériaux de l'environnement. Ces spécifications existent sous forme de gènes dans l'œuf fécondé. C'est à l'aide de l'information contenue dans les gènes que le gland devient un chêne et la spore de mousse une mousse.

De même qu'ils entretiennent les différences entre le chêne et la mousse, les gènes perpétuent les différences au sein même des espèces. Voyez les plantes de l'espèce *Plectritis congesta*. Dans la nature, on trouve deux formes de cette espèce : l'une possède des fruits sans ailes et l'autre des fruits ailés (figure 1-12). Ces plantes s'autopollinisent et la descendance qui en résulte peut être étudiée après croissance en serre dans des conditions uniformes : on constate habituellement que les descendants d'une plante à fruits ailés ont tous des fruits ailés tandis que ceux d'une plante à fruits sans ailes sont tous dépourvus d'ailes. Puisque tous les descendants ont été cultivés dans le même environnement, on peut écarter la possibilité que des différences d'environnement soient responsables de ce que certaines plantes portent de fruits ailés et d'autres des fruits sans ailes. Nous pouvons conclure sans risque d'erreur que les formes de fruits différentes transmises par autofécondation à leurs descendances par les plantes de départ résultent de différences dans les gènes qu'elles portent.

Plectritis possède deux formes héréditaires qui sont toutes deux parfaitement normales. Mais le pouvoir de détermination des gènes est le plus souvent mis en évidence par des différences entre une forme normale et une forme anormale. L'anémie à cellules falciformes, une maladie héréditaire de l'homme, en fournit un bon exemple. La cause de cette maladie est une variation de l'hémoglobine, la molécule protéique transporteuse d'oxygène présente dans les globules rouges. Les individus normaux possèdent une hémoglobine dite de type A qui comporte deux chaînes α et deux chaînes β. Une modification chimique minime de la molécule d'ADN du gène des chaînes β aboutit à la production d'une hémoglobine légèrement altérée, appelée hémoglobine S. Chez les individus qui ne possèdent que l'hémoglobine S, cette modification provoque une maladie grave et, habituellement, la mort. Ce gène agit sur l'organisme par le biais d'un «effet de cascade» complexe illustré à la figure 1-13.

Des observations comme celles-ci conduisent au modèle d'interaction des gènes avec l'environnement de la figure 1-14. Dans ce cas, les gènes agissent comme un ensemble d'instructions qui permettent de bâtir un organisme spécifique à partir des matériaux plus ou moins indifférenciés de l'environnement, comme un plan indique quel type de maison sera construit au moyen des matériaux de base. Les mêmes briques, ciment, bois et clous peuvent selon les plans servir à bâtir un hôtel à plusieurs étages ou une maison basse à toit plat. Un modèle de ce genre suppose que les gènes sont réellement les éléments dominants dans la détermination des organismes, l'environnement se bornant à fournir des matériaux bruts

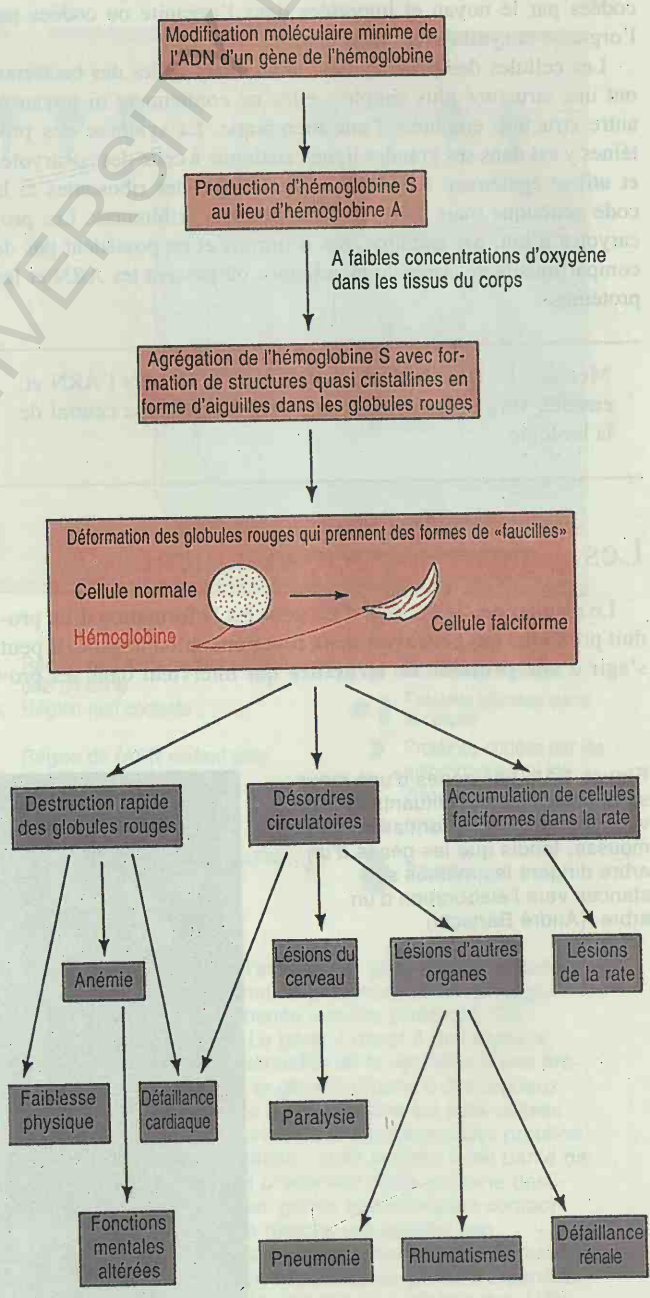


Figure 1-13. Succession des événements qui conduisent à l'apparition de l'anémie à cellules falciformes chez l'homme.

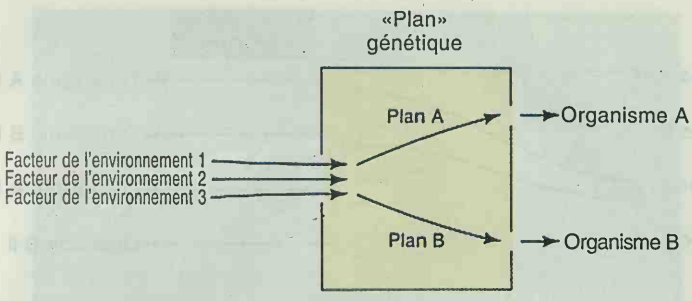


Figure 1-14. Un modèle de détermination qui souligne le rôle des gènes.

indifférenciés.

La détermination par l'environnement

Considérons maintenant le cas de vraies jumelles (monozygotes), c'est-à-dire le produit d'un seul œuf fécondé qui se divise et donne deux individus complets avec les mêmes gènes. Supposons que ces jumelles, nées en Angleterre, soient séparées dès leur naissance et emmenées dans des pays différents. Si l'une est élevée en Chine par des parents adoptifs parlant le chinois, elle parlera parfaitement le chinois, tandis que sa sœur éduquée à Budapest parlera couramment le hongrois. Chacune assimilera les valeurs culturelles et les habitudes de son environnement. Bien que les jumelles entament leurs vies avec des propriétés génétiques identiques, les environnements culturels différents dans lesquels elles vivent produiront des divergences entre elles, et par rapport à leurs parents. Manifestement, les différences, dans ce cas, sont dues à l'environnement et les effets génétiques ont peu d'importance.

Cet exemple suggère le modèle de la figure 1-15, qui est à l'opposé de celui de la figure 1-14. Dans le modèle de la figure 1-15, les gènes influencent le système qui fournit les directives générales pour le développement, mais c'est l'environnement qui détermine le cours réel de ce développement. Imaginez la construction d'une maison dont les seules spécifications seraient que le plancher supporte 150 kilos au mètre carré ou que les murs aient 30 cm d'épaisseur ; l'aspect et la structure du bâtiment seraient donc déterminés uniquement par les matériaux de construction disponibles.

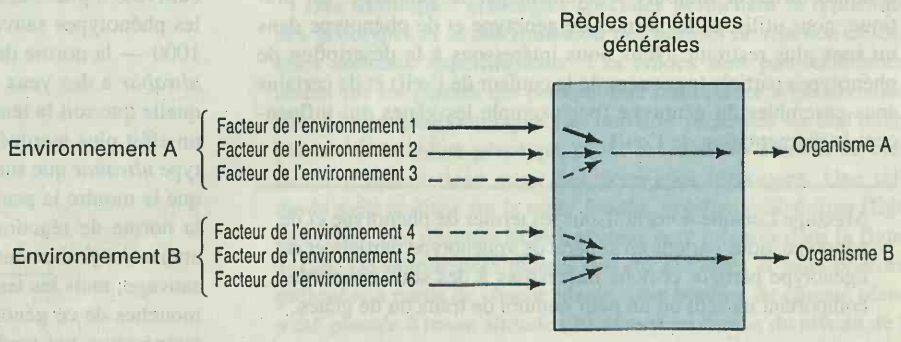
Ces différents exemples—opposant des effets purement génétiques à une influence de l'environnement—inspirent deux modèles très différents. Considérons d'abord l'exemple des graines : disposant d'une paire de graines et d'un environnement uniforme, il nous est impossible de prévoir le déroulement de la croissance sur la seule base de la connaissance de l'environnement. Dans n'importe quel environnement, si les organismes se développent, le gland deviendra un chêne et la spore donnera une mousse. C'est le modèle de la figure 1-14 qui s'applique dans ce cas. Considérons d'autre part les jumelles : aucune information contenue dans les gènes qu'elles héritent ne nous permet de prédire quelles seront leurs langues et leurs cultures. Deux individus *génétiquement différents* se développent différemment dans le *même environnement* mais des individus *génétiquement identiques* peuvent se développer autrement dans des *environnements différents*. C'est le modèle de la figure 1-15 qui s'applique ici.

En général, bien sûr, nous avons à faire à des organismes qui diffèrent à la fois par les gènes et par l'environnement. Si nous désirons prédire le résultat du développement d'un organisme vivant, il nous faut d'abord connaître la constitution génétique qu'il a héritée de ses parents. Ensuite, nous devons disposer de l'*ordre chronologique* des environnements auxquels cet organisme sera exposé au cours de son développement. Le développement de chaque organisme a une histoire, de la naissance à la mort. Ce qu'un organisme va devenir au moment suivant dépend d'une manière cruciale de l'environnement qu'il rencontrera à ce moment, autant que de l'état présent. Ce qui est important pour l'organisme, ce sont non seulement les environnements qu'il rencontre mais aussi l'ordre dans lequel il les rencontre. La mouche du vinaigre (*Drosophila*) se développe normalement à 20°C. Si la température est brièvement élevée à 37°C au stade précoce du développement de la pupe, la mouche adulte sera dépourvue d'une partie de la nervation normale des ailes. Toutefois, si ce «choc de température» est administré 24 heures plus tard, la nervation se développe normalement.

La manière dont interagissent les gènes et l'environnement conduit à envisager un modèle plus général (figure 1-16) dans lequel les gènes et l'environnement déterminent ensemble (par des règles de développement) les caractéristiques de l'organisme considéré.

Message Les transformations subies par un organisme au cours de son passage d'un stade de la vie à un autre résultent de l'interaction de ses gènes avec son environnement à chaque moment de son histoire. C'est l'interaction des gènes et de l'environnement qui détermine ce que sont les organismes.

Figure 1-15. Un modèle de détermination qui souligne le rôle de l'environnement.



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

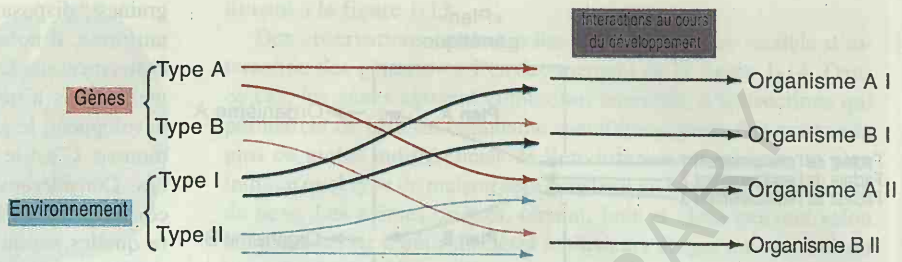


Figure 1-16. Un modèle de détermination qui insiste sur l'interaction des gènes et de l'environnement.

Le génotype et le phénotype

Au cours de l'étude de la manière dont les gènes et l'environnement interagissent pour façonner un organisme, les généticiens ont créé un certain nombre de termes utiles que nous introduisons dans cette section.

Un organisme typique ressemble plus à ses parents qu'à des individus avec lesquels il n'a aucune parenté. C'est pourquoi nous nous exprimons souvent comme si les caractéristiques individuelles elles-mêmes étaient héritées : «Il a le cerveau de sa mère», ou «Elle a hérité du diabète de son père». Pourtant, notre discussion de la section précédente a montré que de telles affirmations sont inexactes. «Son cerveau» et «son diabète» se développent au cours de longues successions d'événements dans l'histoire des personnes affectées et les gènes aussi bien que l'environnement interviennent dans cette succession d'événements. Au sens biologique, les individus n'héritent que des structures moléculaires des œufs fécondés à partir desquels ils se développent. Ils héritent de leurs *gènes*, et non des produits finals de leurs développements individuels.

Pour éviter de telles confusions entre les gènes (qui sont hérités) et les résultats de leur action (qui ne le sont pas), les généticiens font une distinction fondamentale entre le génotype et le phénotype d'un organisme. Des organismes appartiennent au même **génotype** s'ils ont le même jeu de gènes, mais des organismes possèdent le même **phénotype** s'ils se ressemblent sur le plan morphologique ou fonctionnel.

Au sens strict, le génotype représente le jeu complet des gènes hérités par un individu tandis que le phénotype décrit tous les aspects de la morphologie, de la physiologie, du comportement et des relations de ce même individu avec son environnement. En ce sens, deux individus ne peuvent jamais présenter strictement le même phénotype, parce qu'il y a toujours quelque différence, si minime soit elle, entre eux sur le plan morphologique ou physiologique. De plus, sauf pour des individus produits à partir d'un autre organisme par reproduction asexuée, deux organismes quelconques diffèrent toujours légèrement par le génotype. En pratique, nous utilisons les termes de génotype et de phénotype dans un sens plus restreint. Nous nous intéressons à la description de phénotypes partiels (par exemple la couleur de l'œil) et de certains sous-ensembles du génotype (par exemple les gènes qui influencent la pigmentation de l'œil).

Message Lorsque nous utilisons les termes de phénotype et de génotype, nous parlons en général de «phénotype partiel» et de «génotype partiel» et nous intéressons à des sous-ensembles comportant un seul ou un petit nombre de traits ou de gènes.

Il faut noter une différence importante entre génotype et phénotype : le génotype est par essence un caractère stable d'un organisme donné ; il reste constant pendant toute la vie de cet organisme et n'est absolument pas affecté par les changements de l'environnement. La plupart des phénotypes changent constamment pendant le vie d'un organisme en fonction des interactions de ses gènes avec une série d'environnements successifs. La permanence du génotype n'implique pas la permanence du phénotype.

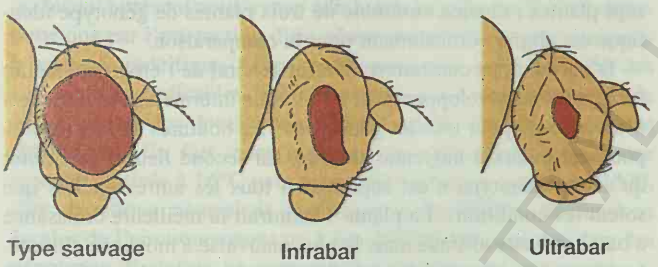
La norme de réaction

Comment pouvons-nous quantifier la relation qui existe entre le génotype, l'environnement et le phénotype ? Pour un génotype particulier, nous pourrions dresser un tableau montrant le phénotype qui résulterait du développement de ce génotype dans chaque environnement possible. Une telle série de relations environnement-phénotype pour un génotype déterminé est appelée la **norme de réaction** du génotype. En pratique, évidemment, nous ne pouvons construire un tel tableau que pour un génotype partiel, un phénotype partiel et pour certains aspects particuliers de l'environnement. Par exemple, nous pourrions représenter les tailles des yeux de mouches du vinaigre qui se sont développées à diverses températures constantes ; nous pourrions réaliser ceci pour plusieurs génotypes de taille de l'œil différents de manière à établir les normes de réaction de l'espèce.

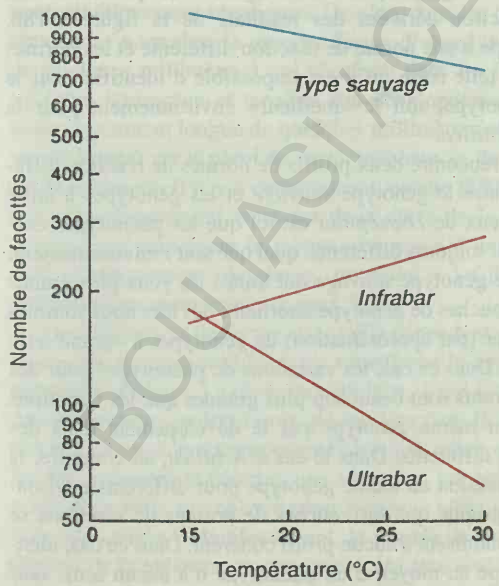
La figure 1-17 représente précisément les normes de réaction pour trois génotypes de la taille de l'œil de la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*. Le graphique est un résumé commode de données plus complètes contenues dans des tableaux. La taille de l'œil de la mouche est mesurée en comptant le nombre de facettes ou de cellules individuelles. L'axe vertical du graphique montre le nombre de facettes (sur une échelle logarithmique) ; l'axe horizontal indique la température constante à laquelle la mouche s'est développée.

Le graphique montre trois normes de réaction. Lorsque des mouches possédant le génotype sauvage caractéristique des populations naturelles sont cultivées à température élevée, elles forment des yeux relativement plus petits que ceux des mouches sauvages cultivées à plus basse température. Le graphique montre que pour les phénotypes sauvages le nombre de facettes varie entre 700 et 1000 — la norme de réaction sauvage. Une mouche de génotype *ultrabar* a des yeux plus petits que les mouches de type sauvage quelle que soit la température de développement. La température a un effet plus marqué sur le développement des mouches de génotype *ultrabar* que sur celui des mouches de génotype sauvage ainsi que le montre la pente plus accentuée de la droite correspondant à la norme de réaction *ultrabar*. Toutes les mouches du génotype anormal *infrabar* ont les yeux plus petits que les mouches de type sauvage, mais les températures élevées ont un effet opposé sur les mouches de ce génotype ; les mouches *infrabar* cultivées à haute température ont tendance à avoir des yeux plus grands que celles

(a)



(b)



(C)

Figure 1-17. Normes de réaction à la température pour trois génotypes différents de la taille de l'œil de *Drosophila.* (a) Vue rapprochée montrant que l'œil normal comporte des centaines d'unités appelées *facettes.* Le nombre de facettes détermine la taille de l'œil. (b) Tailles relatives des yeux de mouches de types sauvage, *infrabar* et *ultrabar* cultivées dans la gamme des températures élevées. (c) Normes de réaction pour les trois génotypes. (Partie a, Don Rio et Sima Misra, Université de Californie, Berkeley.)

cultivées à basse température. Ces normes de réaction indiquent que les relations entre génotype et phénotype sont complexes.

Message Un même génotype peut produire des phénotypes différents selon l'environnement où l'organisme se développe. Le même phénotype peut être produit par des génotypes différents en fonction de l'environnement.

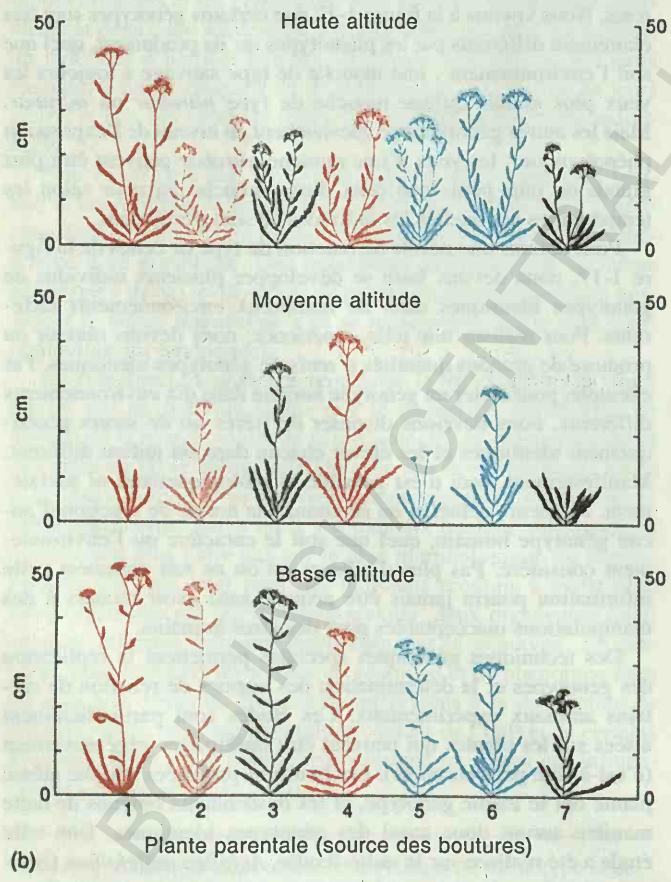
Si nous savons qu'une mouche du vinaigre a le génotype sauvage, cette information ne nous dit pas si son œil comporte 800 ou 1.000 facettes. D'autre part, savoir que l'œil de la mouche du vinaigre possède 170 facettes ne nous dit pas s'il s'agit d'un génotype *ultrabar* ou *infrabar.* Nous ne pouvons pas tirer de conclusion générale quant à l'effet de la température sur la taille de l'œil de *Drosophila* puisque cet effet est inverse pour deux génotypes différents. Nous voyons à la figure 1-17 que certains génotypes sont très clairement différents par les phénotypes qu'ils produisent, quel que soit l'environnement : une mouche de type sauvage a toujours les yeux plus grands qu'une mouche de type *ultrabar* ou *infrabar.* Mais les autres génotypes se chevauchent au niveau de l'expression phénotypique : les yeux d'une mouche *ultrabar* peuvent être plus grands ou plus petits que ceux d'une mouche *infrabar* selon les températures auxquelles les individus se sont développés.

Pour obtenir une norme de réaction du type de celles de la figure 1-17, nous devons faire se développer plusieurs individus de génotypes identiques dans de nombreux environnements différents. Pour réaliser une telle expérience, nous devons obtenir ou produire de grandes quantités d'œufs de génotypes identiques. Par exemple, pour tester un génotype humain dans dix environnements différents, nous devrions disposer de frères ou de sœurs génétiquement identiques et les élever chacun dans un milieu différent. Manifestement, ceci n'est possible ni biologiquement ni socialement. A l'heure actuelle, on ne connaît la norme de réaction d'aucun génotype humain, quel que soit le caractère ou l'environnement considéré. Pas plus d'ailleurs qu'on ne sait comment cette information pourra jamais être acquise sans avoir recours à des manipulations inacceptables pour des êtres humains.

Des techniques génétiques spéciales permettent la réplication des génotypes et la détermination des normes de réaction de certains animaux expérimentaux. Ces études sont particulièrement aisées sur les plantes qui peuvent être multipliées végétativement (c'est-à-dire par bouturage). Les boutures prélevées sur une même plante ont le même génotype, et les descendants obtenus de cette manière auront donc aussi des génotypes identiques. Une telle étude a été réalisée sur le mille-feuille, *Achillea millefolium* (figure 1-18a). Les résultats expérimentaux sont montrés dans la figure 1-18b. De nombreuses plantes ont été récoltées et trois boutures prélevées à partir de chaque plante. Une bouture de chaque plante a été plantée à basse altitude (30 mètres au dessus du niveau de la mer), une seconde à moyenne altitude (1.400 mètres), et la troisiè-

BCU IASI / CENTRE UNIVERSITAIRE LIBRARY

(a)



(b)

Figure 1-18. (a) *Achillea millefolium.* (b) Normes de réaction à l'altitude de sept plantes d'*Achillea* différentes (sept génotypes différents). Une bouture de chaque plante a été cultivée à basse, moyenne et haute altitudes (Partie a, Harper Horticultural Slide Library ; partie B, Carnegie Institution of Washington)

me à haute altitude (3.050 mètres). La figure 1-18b montre les individus adultes qui se sont développés à partir des boutures de sept plantes ; chaque ensemble de trois plantes de génotype identique est aligné verticalement pour la comparaison.

D'abord, nous constatons un effet général de l'environnement : les plantes se développent mal à l'altitude intermédiaire. Mais ceci n'est pas vrai pour tous les génotypes ; les boutures de la plante 24 poussent mieux à moyenne altitude. En second lieu, il faut noter qu'aucun génotype n'est supérieur à tous les autres quelles que soient les conditions. La plante 1 montrait la meilleure croissance à basse et haute altitude mais la plus mauvaise à moyenne altitude. La plante 6 se plaçait à l'avant-dernière place pour la croissance à basse altitude mais à la deuxième pour la haute altitude. Une fois encore, nous percevons la complexité des relations entre génotype et phénotype. Les graphiques de la figure 1-19 présentent les normes de réaction dérivées des résultats de la figure 1-18b. Chaque génotype a une norme de réaction différente et les normes se croisent, de telle sorte qu'il est impossible d'identifier soit le «meilleur» génotype, soit le «meilleur» environnement pour la croissance d'*Achillea*.

Nous avons rencontré deux profils de normes de réaction différents. L'écart entre le génotype *sauvage* et les génotypes à taille anormale des yeux de *Drosophila* est tel que les phénotypes correspondants sont toujours différents, quel que soit l'environnement. Les mouches de génotype *sauvage* ont toutes les yeux plus grands que ceux des mouches de génotype anormal ; dès lors nous sommes autorisés à parler (par approximation) de génotypes à «grand œil» et à «petit œil». Dans ce cas, les variations de phénotypes pour des génotypes différents sont beaucoup plus grandes que les variations causées dans un même génotype par le développement dans des environnements différents. Dans le cas d'*Achillea*, au contraire, la variation d'expression du même génotype pour différents environnements est si grande que les courbes de normes de réactions se croisent et ne conduisent à aucun profil cohérent. Dans ce cas, identifier un génotype au moyen d'un phénotype n'a aucun sens, sauf en termes de réponse à des environnements particuliers.

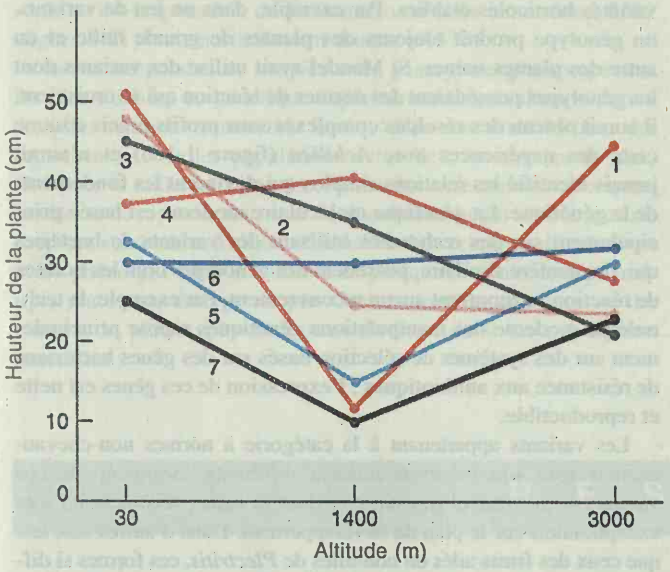


Figure 1-19. Représentation graphique de l'ensemble des résultats de la figure 1-18. Chaque ligne représente les normes de réaction d'une plante séparée.

Fluctuations perturbant le cours du développement

Jusqu'à présent nous avons admis que le phénotype n'est déterminé que par l'interaction d'un génotype spécifique avec un environnement spécifique. Mais un examen plus attentif révèle des variations inexplicables. Selon la figure 1-17, une drosophile de génotype sauvage développée à 16°C possède 1.000 facettes dans chaque œil. En fait, ceci n'est qu'une valeur moyenne ; une mouche cultivée à 16°C peut avoir 980 facettes et une autre 1020. Ces variations pourraient être dues à de légères fluctuations locales de l'environnement ou à des différences minimes dans les génotypes. Toutefois, un comptage peut montrer qu'une mouche a, par exemple, 1.017 facettes dans l'œil gauche et 982 dans le droit. Chez une autre mouche, l'œil gauche a un peu moins de facettes que le droit. Pourtant les yeux gauche et droit d'une même mouche sont génétiquement identiques. De plus, dans les conditions expérimentales normales, la mouche forme d'abord une larve (longue de quelques millimètres) qui s'enfouit dans un flacon d'aliment artificiel homogène et termine son développement par un stade pupe (également longue de quelques millimètres) où elle est collée verticalement sur la paroi de verre, très haut au-dessus de la surface de l'aliment. Il n'y a certainement aucune différence significative d'environnement entre les deux côtés de la mouche. Si les deux yeux connaissent la même succession d'environnements et sont génétiquement identiques, pourquoi y a-t-il une différence phénotypique entre les deux yeux ?

Les différences de forme et de taille dépendent en partie du processus de division cellulaire qui transforme le zygote en organisme multicellulaire. La division cellulaire, à son tour, est sensible à des événements moléculaires qui ont lieu dans la cellule, et ceux-ci peuvent avoir une composante aléatoire relativement importante. Par exemple, la biotine, une vitamine, est essentielle pour la croissance mais sa concentration *moyenne* n'est que d'une molécule par cellule ! Manifestement, la vitesse de tout processus qui dépend de la présence de cette molécule sera sensible aux fluctuations de la concentration de biotine. Mais les cellules ne peuvent se diviser pour produire des cellules oculaires différenciées que pendant la période relativement courte du développement où l'œil se forme. Dès lors, nous devons nous attendre à des variations aléatoires de caractères phénotypiques tels que le nombre de facettes de l'œil, l'abondance des cheveux ou d'autres petits détails morphologiques aussi bien qu'à des variations des neurones dans un système nerveux central très complexe—même lorsque le génotype et l'environnement sont fixés de manière très précise. Même des structures comme le système nerveux très élémentaire des nématodes présentent des variations pour cette même raison. Des événements aléatoires au cours du développement conduisent à des variations du phénotype ; ces variations sont appelées des **fluctuations perturbant le cours du développement.**

Message Pour certains caractères comme les facettes de l'œil de la drosophile, les fluctuations perturbant le cours du développement sont une source majeure de variation des phénotypes.

Comme le bruit gêne une communication verbale, les fluctuations pertubant le cours du développement provoquent de petites variations aléatoires intervenant comme un bruit de fond dans le processus du développement gouverné par les normes de réaction. En ajoutant ces fluctuations à notre modèle de développement phénotypique nous obtenons le modèle de détermination phénotypique de la figure 1-20. Pour un génotype et un environnement donnés, il y a toute une gamme de résultats possibles pour chaque étape du développement. Mais le processus du développement comporte des systèmes de rétroaction (feedback) qui tendent à maintenir les déviations dans certaines limites de manière à éviter que leur amplitude n'augmente indéfiniment au cours des nombreuses étapes du développement. Néanmoins, ces rétroactions ne sont pas parfaites et pour un génotype donné et une succession déterminée d'environnements au cours du développement, il subsiste une certaine incertitude quant au phénotype précis qui sera obtenu.

Les techniques de l'analyse génétique

Nos discussions se sont fondées jusqu'à présent sur une sagesse à posteriori. La richesse des connaissances actuelles en géné-

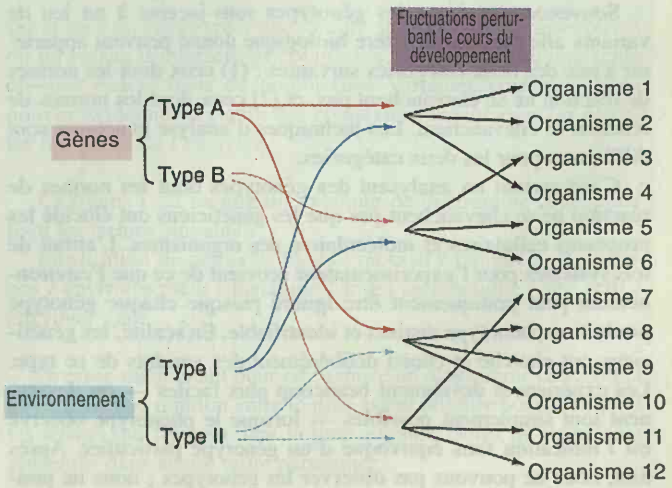


Figure 1-20. Un modèle de détermination phénotypique qui montre comment les gènes, l'environnement et les fluctuations perturbant le cours du développement interagissent pour fournir un phénotype donné.

tique nous autorise à des généralisations en ce qui concerne l'ADN, les gènes, les phénotypes et les génotypes comme si ces concepts tombaient sous le sens. Mais ceci n'a évidemment pas toujours été le cas ; les connaissances actuelles résultent d'années de recherches. Mendel, par exemple, ne possédait presque certainement aucune base conceptuelle au début de ses travaux, mais il fut parfaitement capable de coordonner les résultats de ses nombreuses expériences pour en tirer des principes génétiques. Ceci vaut pour les recherches génétiques en général : nous partons dans l'inconnu et les idées et les faits se font jour au cours de l'expérimentation. Mais, comment fonctionne la génétique de tous les jours ? La majeure partie de ce livre sera consacrée à cette question, mais nous commencerons par un survol des principes de l'expérimentation génétique.

Nous avons vu que le processus qui consiste à identifier les composants héréditaires d'un système biologique est appelé la **dissection génétique**. Ainsi qu'un anatomiste fouille les structures et les fonctions biologiques à l'aide d'un scalpel, le généticien les sonde au moyen de variants génétiques, en général anormaux. Si le généticien s'intéresse au processus biologique X, il entamera la recherche de variants génétiques affectés dans X. Chaque variant touche un composant différent de X. Ainsi qu'un mécanicien automobile novice peut apprendre beaucoup du fonctionnement d'un moteur à combustion interne en enlevant un fil de bougie, le généticien fait le même type de «bricolage» sur un être vivant.

Message La dissection génétique est un moyen puissant d'identifier les composants de n'importe quel processus biologique.

Les généticiens utilisent et analysent des variants héréditaires, une approche qui est efficace depuis le niveau moléculaire, où elle permet l'étude des processus fondamentaux de la cellule et des organismes, jusqu'au niveau des populations où elle permet d'approfondir les mécanismes de l'évolution. La gamme des variants qui ont été obtenus et analysés efficacement par les généticiens est étonnamment large ; comme nous l'avons vu, il y a des variants qui affectent la forme, le nombre, les fonctions biochimiques et bien d'autres propriétés. L'on a obtenu à présent des variants génétiques pour pratiquement toute structure ou tout processus susceptible d'intéresser un chercheur.

Souvenons-nous que les génotypes sous-jacents à un jeu de variants affectant un caractère biologique donné peuvent appartenir à une des deux catégories suivantes : (1) ceux dont les normes de réaction ne se chevauchent pas, et (2) ceux dont les normes de réaction se chevauchent. Les techniques d'analyse génétique sont différentes pour les deux catégories.

C'est surtout en analysant des génotypes dont les normes de réaction ne se chevauchent pas que les généticiens ont élucidé les processus cellulaires et moléculaires des organismes. L'attrait de tels systèmes pour l'expérimentateur provient de ce que l'environnement peut pratiquement être ignoré puisque chaque génotype produit un phénotype distinct et identifiable. En réalité, les généticiens ont cherché et choisi délibérément des variants de ce type. Les expériences deviennent beaucoup plus faciles — ou deviennent tout simplement possibles — lorsque le phénotype observé est l'indication sans équivoque d'un génotype particulier. Après tout, nous ne pouvons pas observer les génotypes ; nous ne pouvons distinguer que les phénotypes.

Le fait de disposer de tels variants a rendu possibles les expériences de Mendel. Il a employé des génotypes qui étaient des variétés horticoles établies. Par exemple, dans un jeu de variants, un génotype produit toujours des plantes de grande taille et un autre des plantes naines. Si Mendel avait utilisé des variants dont les génotypes possédaient des normes de réaction qui se croisaient, il aurait obtenu des résultats complexes sans profils précis comme ceux des expériences avec *Achillea* (figure 1-18b) et n'aurait jamais identifié les relations simples qui devinrent les fondements de la génétique. La génétique moléculaire moderne est basée principalement sur des recherches utilisant des variants de bactéries qui, de manière similaire, possèdent des génotypes dont les normes de réaction ne montrent aucun recouvrement. Par exemple, la technologie moderne des manipulations génétiques repose principalement sur des systèmes de sélection basés sur des gènes bactériens de résistance aux antibiotiques ; l'expression de ces gènes est nette et reproductible.

Les variants appartenant à la catégorie à normes non-chevauchantes sont souvent étonnamment différents. Beaucoup de ces variants ne pourraient pas survivre dans la nature tellement ils sont exceptionnels sur le plan du développement. Dans d'autres cas, tels que ceux des fruits ailés ou non-ailés de *Plectritis*, ces formes si différentes apparaissent régulièrement dans les populations naturelles.

Etant donné l'importance des variants à phénotypes distincts, le reste de ce livre sera surtout consacré à l'analyse de ce type de variations. L'ouvrage débute par les travaux et les théories de Mendel, se poursuit par la génétique classique et se termine par les découvertes marquantes de la biologie moléculaire. Il faut souligner que l'acquisition des connaissances actuelles a reposé essentiellement sur la disponibilité de phénotypes possédant des relations simples avec les génotypes. Notre présentation de l'analyse génétique insiste tellement sur ces différences de traits simples que vous pourriez avoir l'impression qu'ils représentent la relation la plus commune entre gènes et caractères. Mais il n'en est rien. Les généticiens doivent prendre le temps de trouver des ensembles de variants dont les génotypes correspondent à des phénotypes simples. Par exemple, bien que des centaines de mutations de la drosophile aient été bien caractérisées, un quart d'entre elles seulement convient parfaitement pour une analyse génétique détaillée. L'environnement et le degré de développement peuvent être très importants même pour l'expression des variants les plus courants. La mutation *pourpre*, si utilisée, confère à l'œil des très jeunes mouches une couleur analogue au rouge normal et ce n'est qu'avec l'âge que l'œil fonce et qu'une différence apparaît. La mutation *curly*, un des outils essentiels de l'analyse génétique chez la dro-

Figure 1-21. Le variant à ailes incurvées de *Drosophila melanogaster*, dû à une modification génétique d'un seul gène. Chez les mouches sauvages, les ailes sont plates. (Peter Bryant / BPS)

sophile, est responsable de la formation d'ailes incurvées à 25°C (figure 1-21) mais normalement droites à 19°C.

Les correspondances simples entre génotype et phénotype sont les plus utilisées en génétique expérimentale, mais dans la nature de telles relations sont rares. Lorsqu'elles sont établies pour des organismes issus des populations naturelles, les normes de réaction pour la taille, la forme, la couleur, les cadences métaboliques, la vitesse de reproduction et le comportement apparaissent presque toujours semblables à celles d'*Achillea*. Les relations du génotype et du phénotype dans la nature sont presque toujours de type multiple plutôt que de type simple. Ceci est la raison de la rareté des classes de phénotypes nettement distincts dans les populations naturelles.

Manifestement, l'analyse des relations multiples est infiniment plus compliquée. L'expérimentateur est confronté à un nombre déroutant de phénotypes. Des techniques statistiques spéciales sont nécessaires pour débrouiller les composants liés au génotype, à l'environnement et au bruit de fond. Le chapitre 24 traite de ces techniques.

Message En général, la relation entre génotype et phénotype ne peut pas être extrapolée d'une espèce à une autre ou même entre des caractères phénotypiques qui semblent superficiellement semblables dans une même espèce. Une analyse génétique est nécessaire pour chaque cas particulier

RÉSUMÉ

La génétique, c'est-à-dire l'étude des gènes à tous les niveaux, des molécules aux populations, est devenue une discipline moderne à partir des travaux de Gregor Mendel qui, dans les années 1860, fut le premier à formuler l'idée de l'existence de gènes. Nous savons maintenant qu'un gène est une région fonctionnelle d'une longue molécule d'ADN qui constitue la structure de base du chromosome.

La génétique a profondément influencé les activités de l'homme. La majorité de nos aliments et de nos vêtements provient d'organismes améliorés génétiquement et ces possibilités d'amélioration sont encore accrues par l'ingénierie génétique. De plus, une large proportion des maladies qui frappent l'homme présentent des aspects génétiques. La recherche en génétique a aussi profondément changé notre manière de nous situer par rapport au monde organique et au reste de l'univers.

La génétique a révolutionné la biologie en montrant que la plupart des organismes de cette planète utilisent le même système de stockage et d'expression de l'information basé sur l'ADN — un système où l'information circule de l'ADN vers l'ARN et de l'ARN vers les protéines. De plus, la dissection génétique est un outil analytique performant qui est utilisé dans toutes les sciences biologiques.

Les gènes ne travaillent pas dans le vide et la production d'un phénotype implique des interactions avec divers niveaux de l'environnement. La relation du génotype avec le phénotype pour un domaine donné de l'environnement est appelée la norme de réaction. La plupart des acquis majeurs de la génétique ont résulté de l'étude de systèmes de laboratoire présentant une correspondance simple, de type «univoque», entre le génotype et le phénotype. Mais, dans les populations naturelles, la variation phénotypique présente en général une relation plus complexe avec le génotype que la simple correspondance univoque.

Les diagrammes conceptuels

Chaque chapitre comportera un exercice de construction d'un diagramme conceptuel. En dressant ces diagrammes, vous pourrez organiser les notions que vous venez d'acquérir et les mettre en place dans le cadre conceptuel général de la discipline. Une part essentielle de ce travail consiste à discerner les relations qui existent entre les notions anciennes et nouvelles. Ce n'est pas aussi facile que cela paraît et on peut parfois faussement s'imaginer posséder une vue d'ensemble. Les diagrammes conceptuels sont un bon moyen de vérifier que nous savons vraiment comment les différents processus, structures et principes de la génétiques sont liés. Ces diagrammes peuvent également nous aider à déceler les lacunes de notre compréhension.

Un choix de termes est fourni au départ et le but est de tracer des lignes ou des flèches entre ceux que vous croyez liés en indiquant le type de relation sur la flèche. Tracez autant de relations que vous pouvez. Forcez-vous à établir des connexions, si ténues qu'elles puissent vous paraître à première vue. Les indications figurant sur les flèches doivent être suffisamment claires pour qu'un autre puisse comprendre votre pensée. Un diagramme peut, selon les cas, représenter une simple série d'étapes consécutives ou un réseau d'interactions complexes. Il n'y a pas qu'une seule réponse exacte mais de nombreuses variantes correctes. Vous pouvez évidemment établir des connexions inexactes et les détecter fait partie de l'exercice.

La figure 1-22 montre un exemple de diagramme conceptuel liant les termes suivants :

substitution de paires de bases / récessif / rapport 3 : 1 / albinos / environnement / mélanine / trajet métabolique / site actif / enzyme / gène

Dressez maintenant pour ce chapitre un diagramme conceptuel qui établit une relation entre le plus grand nombre possible parmi les termes qui figurent dans la liste qui suit. Notez qu'ils ne sont présentés dans aucun ordre particulier.

génotype / phénotype / norme de réaction / fluctuation au cours du développement / environnement / développement / organisme

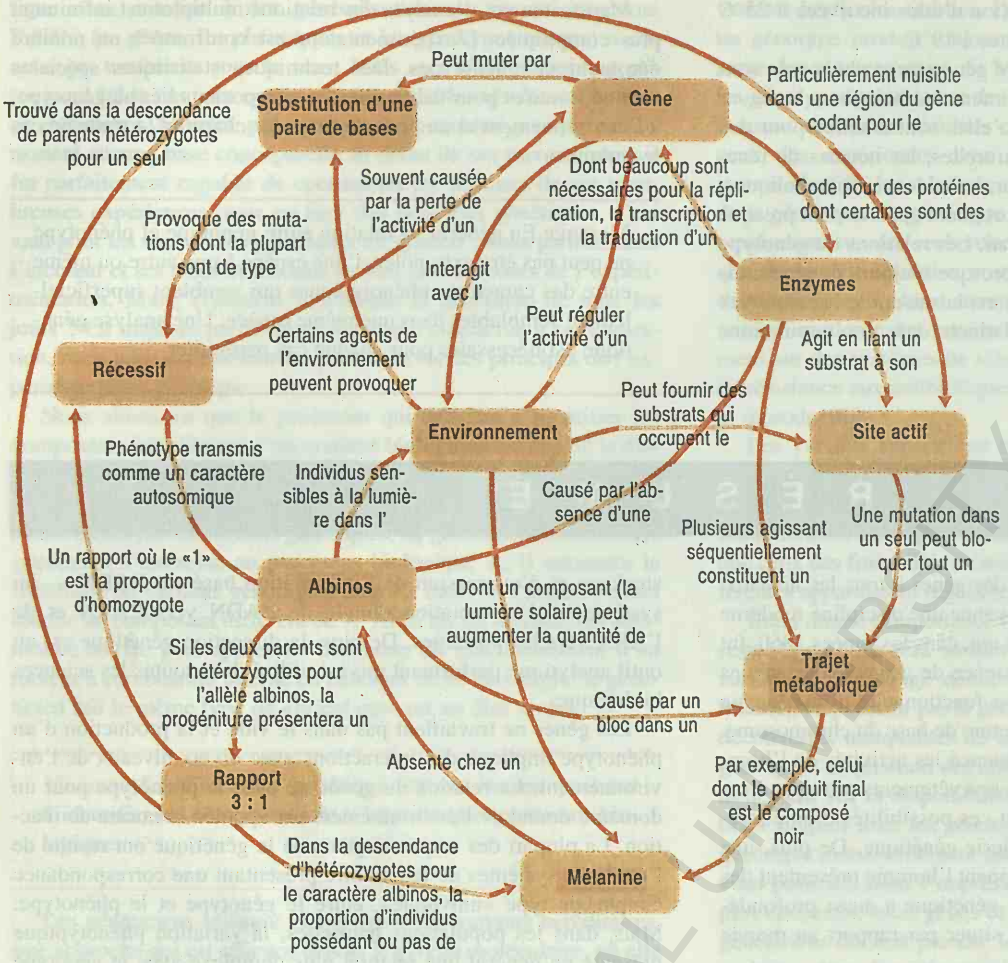


Figure 1-22. Exemple de diagramme conceptuel.

QUESTIONS GÉNÉRALES

1. Définissez la génétique. Croyez-vous que les éleveurs de chevaux de course de l'Egypte ancienne étaient des généticiens ? En quoi leurs méthodes différaient-elles de celles des généticiens modernes ?

2. Citez trois manières dont la génétique a influencé la société moderne.

3. Comment l'ADN détermine-t-il les propriétés générales d'une espèce ?

4. Quelles sont les deux caractéristiques de l'ADN qui font qu'il convient pour jouer le rôle de molécule héréditaire ? Pouvez-vous imaginer d'autres types de molécules héréditaires susceptibles d'exister chez des êtres vivants extra-terrestres ?

5. Quelle est la pertinence des normes de réaction pour la variation phénotypique au sein d'une espèce ?

6. Citez quelques causes de variations phénotypiques au sein d'une espèce.

7. La formule *génotype* + *environnement* = *phénotype* est-elle exacte ?

8. Citez cinq dilemmes d'ordre éthique en génétique.

9. Quel est l'objectif de la dissection génétique ?

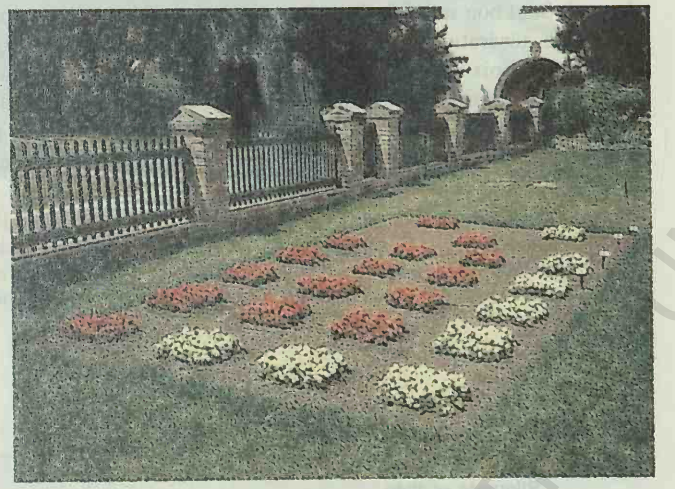
10. En quoi la génétique a-t-elle unifié la biologie ?

BOHIASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

2

L'analyse mendélienne



Le petit jardin du monastère où Grégor Mendel effectua ses expériences sur le pois. On aperçoit une statue de Mendel à l'arrière-plan. Aujourd'hui cette partie du monastère est un musée; les conservateurs y ont planté des bégonias à fleurs rouges ou blanches selon un ordre qui représente graphiquement certains des résultats de Mendel.

CONCEPTS-CLÉS

- L'observation de rapports reproductibles dans la descendance de croisements entre variants héréditaires permet de conclure à l'existence des gènes.
- Une dissemblance de trait distinctif reflète souvent la modification d'un seul gène.
- Les organismes supérieurs possèdent deux exemplaires de chaque gène dans chacune de leurs cellules.
- Durant leur formation, les gamètes reçoivent chacun l'un des membres de chaque paire de gènes.
- Pendant la formation des gamètes, différents gènes se comportent souvent indépendamment les uns des autres.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Le gène, unité fonctionnelle fondamentale de l'hérédité, est le point de convergence des différentes disciplines de la génétique moderne. Dans toutes les voies de la recherche génétique c'est le gène qui forme le trait d'union entre des expériences qui peuvent être très diverses. Les généticiens s'intéressent à la transmission des gènes de génération en génération, à la nature des gènes, à leur variation et aux mécanismes par lesquels ils déterminent les particularités de chaque espèce.

Dans ce chapitre nous retraçons la naissance du concept de gène. Nous verrons que la génétique est, d'une certaine manière, une science abstraite : la plupart de ses entités s'annoncèrent comme des constructions hypothétiques dans l'esprit des généticiens avant de se faire reconnaître comme des réalités physiques.

Le concept de gène (mais non le terme) fut proposé pour la première fois en 1865 par Grégor Mendel. Jusqu'alors on n'avait que peu progressé dans la compréhension de l'hérédité. L'idée prédominante était que le spermatozoïde et l'œuf contenaient chacun un échantillonnage d'«essences» provenant des différentes parties de l'organisme parental ; à la conception ces essences se mêlaient et déterminaient ainsi le profil du nouvel individu. Cette idée d'**hérédité par mélange** fut développée pour expliquer le fait que les descendants présentent fréquemment des caractéristiques communes aux deux parents. Néanmoins cette idée pose des problèmes évidents ; par exemple, la descendance ne se présente pas toujours comme une combinaison intermédiaire des caractéristiques parentales. Les tentatives qui furent faites pour accroître la portée de cette théorie et pour l'améliorer ne firent pas progresser notre compréhension de l'hérédité.

A la suite de ses recherches sur des plants de pois, Mendel proposa au contraire une **théorie particulaire de l'hérédité**. Dans la théorie de Mendel les caractères sont déterminés par des unités discrètes qui se transmettent intactes au fil des générations. Ce modèle expliquait de nombreuses observations dont ne pouvait rendre compte l'idée d'une hérédité par mélange. Il s'avéra aussi un excellent schéma de référence pour faire progresser notre connaissance des mécanismes de l'hérédité.

L'importance des idées de Mendel ne fut reconnue qu'aux environs de 1900, bien après sa mort. Son œuvre écrite fut alors redécouverte par trois hommes de science après que chacun d'entre eux eût retrouvé, d'une manière indépendante, le même genre de résultats. Le travail de Mendel est le prototype de l'analyse génétique. Il établit les règles d'une approche expérimentale et logique qui est toujours en usage aujourd'hui.

Les expériences de Mendel

Les travaux de Mendel fournissent un exemple hors pair de bonne technique scientifique. Il choisit un matériel de recherche convenant bien à l'étude du problème à résoudre, conçut ses expériences avec circonspection, recueillit un grand nombre de données et recourut à l'analyse mathématique pour montrer que les résultats s'accordaient avec l'hypothèse qu'il formulait pour les expliquer. Les prédictions de l'hypothèse furent alors mises à l'épreuve d'une nouvelle série d'expériences.

Mendel choisit d'étudier le pois (*Pisum sativum*) pour deux raisons principales. En premier lieu, il pouvait trouver chez un grainetier un vaste éventail de variétés de pois de formes et de couleurs distinctes, aisément identifiables. En deuxième lieu, les fleurs de pois peuvent soit s'**autoféconder** soit subir une fécondation (ou pollinisation) croisée. Les fleurs de pois s'autofécondent parce que les parties mâles (anthères) et femelles (ovaires) de la fleur — qui produisent respectivement le pollen et les ovules — sont enfermées dans une carène formée par les deux pétales inférieurs (figure 2-1). Le jardinier ou l'expérimentateur peut procéder à volonté au croisement (ou **pollinisation croisée**) de n'importe quelle paire de variétés. Les anthères d'une fleur sont retirées avant d'avoir pu émettre leur pollen ce qui empêche l'autofécondation. Le pollen d'une autre plante est alors transféré sur le stigmate à l'aide d'un pinceau ou en se servant d'anthères entières (figure 2-2). L'expérimentateur peut donc choisir de laisser s'autoféconder les plantes ou de les croiser lui-même.

D'autre motifs d'ordre pratique expliquent le choix de Mendel ; les pois sont bon marché, il est facile de s'en procurer, ils ont un temps de génération court et produisent une nombreuse descendance. Le choix de tout organisme destiné à un programme de recherches génétiques est toujours guidé par des considérations de ce genre. Ce choix est une décision cruciale ; très souvent, il n'obéit pas seulement à des critères scientifiques mais aussi à des motifs plus terre à terre.

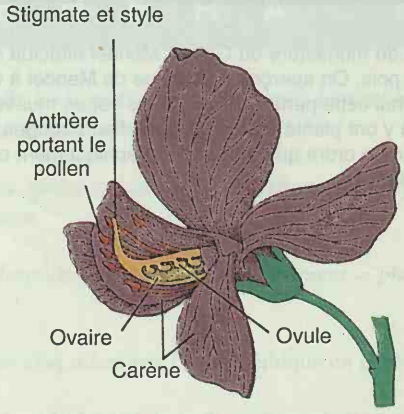


Figure 2-1. Organes reproducteurs d'une fleur de pois, la carène et l'ovaire représentés en coupe. (D'après J.B. Hill, H.W. Popp et A.R. Grove, Jr., *Botany*, Mc Graw-Hill, 1967.)

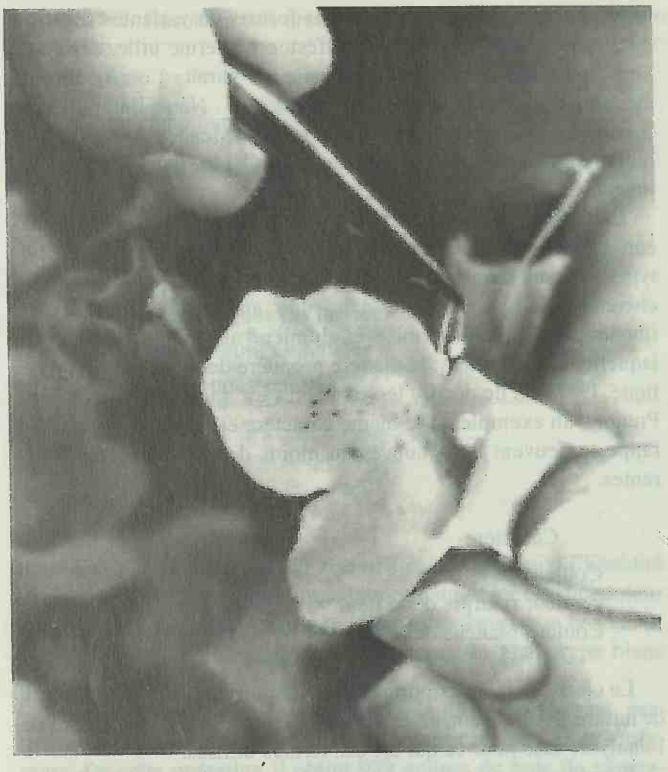


Figure 2-2. Une technique de pollinisation croisée mise en œuvre chez *Mimulus guttatus*, une scrofulariacée. On applique des anthères provenant du parent mâle sur le stigmate d'une fleur émasculée qui joue le rôle de parent femelle. (Anthony Griffiths)

Variétés différant par un caractère

Mendel décida d'étudier plusieurs *caractères*. Ce terme désigne une propriété particulière d'un organisme. Les généticiens l'utilisent ce terme comme synonyme de caractéristique ou trait distinctif.

Mendel se procura des variétés de pois porteuses chacune de l'un des caractères choisis et il les cultiva pendant deux ans pour être certain d'aboutir à des lignées pures. Une **lignée pure** est une population dont les individus donnent des descendants identiques à eux-mêmes en ce qui concerne le caractère considéré. En d'autres termes chez toute la descendance produite par autofécondation ou par croisement au sein de la population, ce caractère a le même aspect. Faire en sorte de pouvoir travailler avec des lignées pures, c'était commencer le travail astucieusement : en effet, Mendel établissait ainsi les conditions qui lui permettraient d'attribuer une signification scientifique à tout changement observé à la suite d'une manipulation délibérée. En réalité il avait conçu là une expérience contrôle.

Deux des variétés cultivées par Mendel se montrèrent pures quant au caractère «couleur de la fleur». L'une des lignées donnait des fleurs pourpres, l'autre des fleurs blanches. Toute plante de la lignée à fleurs pourpres — qu'elle fût autofécondée ou croisée avec d'autres de la même lignée — donnait des graines qui produisaient des plantes à fleurs pourpres. Quant ces plantes, à leur tour étaient autofécondées ou croisées au sein de la lignée, leur descendance exhibait également des fleurs pourpres et ainsi de suite. De manière similaire, la lignée à fleurs blanches ne produisait que des fleurs blanches au fil des générations. Mendel obtint sept paires de lignées pures pour sept caractères, chaque paire ne différant que par un caractère (figure 2-3).

De chacune des paires de lignées choisies par Mendel on dira qu'elle présente une différence au niveau d'un **caractère**. On

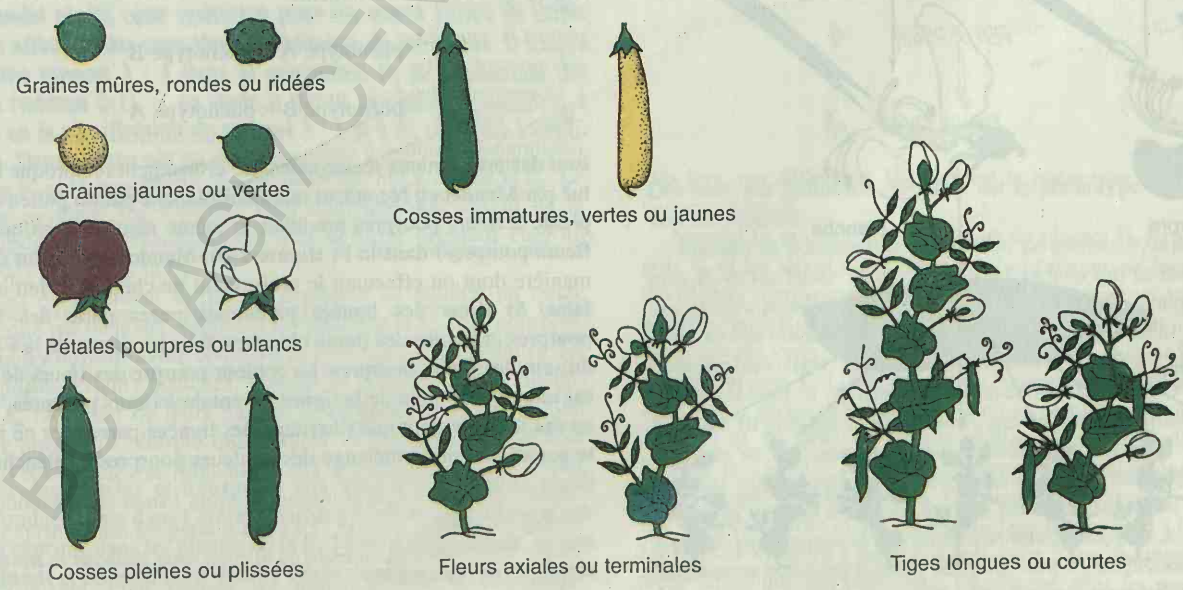


Figure 2-3. Les sept caractères étudiés par Mendel. (D'après S. Singer et H. Hilgard, *The Biology of People*. Copyright © 1978, W.H. Freeman and Company.)

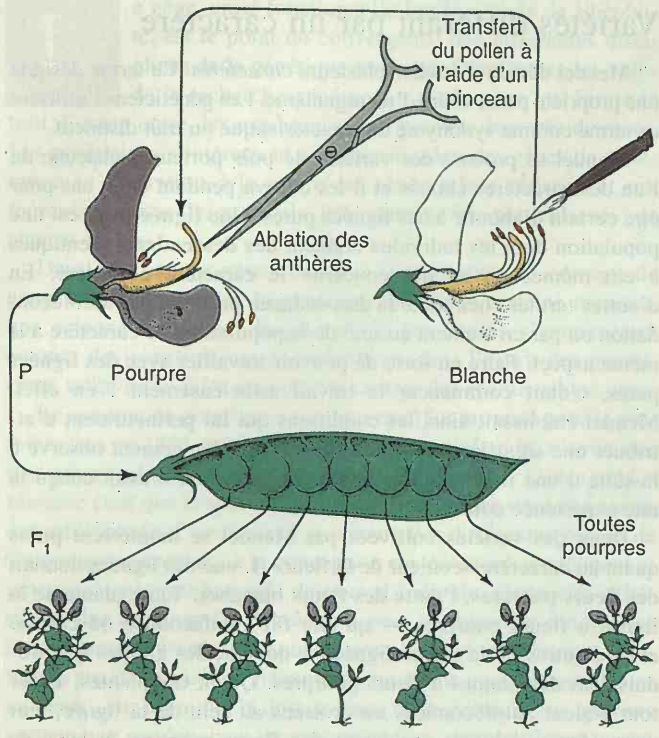


Figure 2-4. Croisement effectué par Mendel entre plantes à fleurs pourpres et à fleurs blanches.

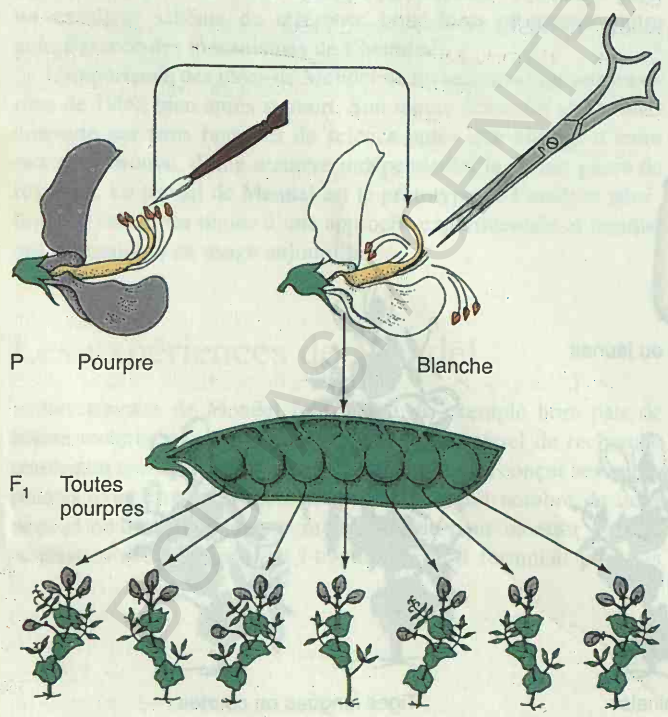


Figure 2-5. Croisement effectué par Mendel entre plantes à fleurs blanches et à fleurs pourpres.

appellera «phénotype» chacune des formes ou variantes sous lesquelles ce caractère peut se manifester. Ce terme utile, dérivé du Grec, signifie littéralement «la forme qui paraît» ; c'est celui qui est utilisé aujourd'hui par les généticiens. Nous l'emploierons dans notre description des expériences de Mendel et dans la formulation de ses hypothèses même si Mendel lui-même ne les a pas inventés.

La figure 2-3 montre sept caractères de pois, représentés chacun par deux phénotypes bien contrastés. Disposer de tels phénotypes pour un caractère donné, c'est le point de départ pour tout chercheur qui s'embarque dans une analyse génétique. Ceci illustre bien la notion mise en lumière au chapitre 1, d'après laquelle la variation est la matière première de toute analyse génétique. La façon de décrire les caractères est quelque peu arbitraire. Prenons un exemple où le même caractère et la différence qui s'y rapporte peuvent être énoncés au moins de trois manières différentes.

Caractère	Phénotypes
Couleur de la fleur	Pourpre ou blanc
Couleur pourpre de la fleur	Présence ou absence
Couleur blanche de la fleur	Absence ou présence

Le choix de la description est souvent affaire de convenance ou de hasard. Heureusement le choix ne change pas les conclusions de l'analyse, sauf pour ce qui est des termes utilisés.

Examinons maintenant certaines des expériences effectuées par Mendel sur des lignées pures pour la couleur des fleurs. Dans l'une de ses premières expériences, Mendel prit du pollen d'une plante à fleurs blanches pour polliniser une plante à fleurs pourpres. On appelle ces plantes originaires de lignées pures la **génération parentale (P).** Toutes les plantes issues de ce croisement eurent des fleurs pourpres (figure 2-4). Cette génération de descendants est appelée la **première génération filiale** (F_1). (Les générations suivantes seront appelées F_2, F_3 et ainsi de suite).

Mendel fit des **croisements réciproques.** Chez la plupart des plantes un croisement peut se faire de deux façons, d'après le phénotype utilisé comme mâle (♂) ou comme femelle (♀). Par exemple, les deux croisements

phénotype A × phénotype B

phénotype B × phénotype A

sont des croisements réciproques. Le croisement réciproque effectué par Mendel en fécondant une fleur blanche par du pollen d'une plante à fleurs pourpres produisit le même résultat (rien que des fleurs pourpres) dans la F_1 (figure 2-5). Mendel en conclut que la manière dont on effectuait le croisement ne changeait rien à l'affaire. Si l'une des lignées parentales pures porte des fleurs pourpres et l'autre des fleurs blanches, tous les plants de la F_1 produisent des fleurs pourpres. La couleur pourpre des fleurs de la F_1 est identique à celle de la lignée parentale à fleurs pourpres. Dans ce cas il est évident que l'héritage des lignées parentales ne résulte pas d'un simple mélange des couleurs pourpres et blanches en

Tableau 2-1. Résultats des croisements effectués par Mendel entre parents différant par un seul caractère

Phénotype parental	F_1	F_2	Rapport à la F_2
1. pois ronds × pois ridés	ronds	5.474 ronds ; 1.850 ridés	2,96 : 1
2. pois jaunes × pois verts	jaunes	6.022 jaunes ; 2.001 verts	3,01 : 1
3. pétales pourpres × pétales blancs	pourpres	705 pourpres ; 224 blancs	3,15 : 1
4. gousses pleines × gousses plissées	pleines	882 pleines ; 299 plissées	2,95 : 1
5. gousses vertes × gousses jaunes	vertes	428 vertes ; 152 jaunes	2,82 : 1
6. fleurs axiales × fleurs terminales	axiales	651 axiales ; 207 terminales	3,14 : 1
7. tiges longues × tiges courtes	longues	787 longues ; 277 courtes	2,84 : 1

une teinte intermédiaire. Pour maintenir une théorie de l'hérédité par mélange des caractères nous devrions supposer que la couleur pourpre est d'une façon où d'une autre «plus forte» que la couleur blanche et efface complètement toute trace du phénotype blanc dans le mélange.

Ensuite, Mendel laissa les plantes de la F_1 s'autoféconder, permettant au pollen de chaque fleur de tomber sur son propre stigmate. De cette opération il obtint 929 graines de pois (la génération F_2) qu'il planta à leur tour. Résultat intéressant, certaines d'entre elles donnèrent naissance à des plantes à fleurs blanches : le phénotype blanc était réapparu . Mendel fit alors une chose qui, plus que toute autre, marque la naissance de la génétique moderne : il *compta* les plantes appartenant à chaque phénotype. Cette façon de procéder n'avait que rarement, si jamais, été utilisée au cours des études génétiques qui ont précédé le travail de Mendel. D'autres que lui avait obtenu des résultats fort semblables mais n'avaient pas dénombré les représentants de chaque classe. Mendel compta 705 plantes à fleurs pourpres et 224 à fleurs blanches. Il se rendit compte que le rapport 705 : 224 était presque de 3 à 1 (en fait 3,15 : 1).

Mendel répéta cette opération pour six autres paires de différences affectant des caractères héréditaires du petit pois. Il trouva le même rapport 3 : 1 dans la génération F_2 pour chacune des paires (tableau 2-1). A ce stade il devait sûrement commencer à croire en la signification du rapport 3 : 1 et à en chercher l'explication. Dans chaque cas un des phénotypes parentaux disparaissait dans la F_1 et réapparaissait chez le quart des individus de la F_2. Le phénotype blanc par exemple était complètement absent de la génération F_1 mais réapparaissait sous sa forme originale chez un quart des plantes de la F_2.

Il est extrêmement difficile d'expliquer ce résultat en terme d'hérédité par mélange. Même si les fleurs de la F_1 sont pourpres, les plantes doivent avoir conservé la *potentialité* de produire des descendants à fleurs blanches. Mendel en déduisit que les plantes de la F_1 reçoivent de leurs parents la capacité de produire aussi bien le phénotype pourpre que le blanc et que ces capacités sont conservées intactes et transmises aux générations futures plutôt que fondues l'une dans l'autre. Pourquoi le phénotype blanc n'est-il pas exprimé dans les plantes de la F_1 ? Mendel inventa les termes dominant et récessif pour décrire ce phénomène sans en expliquer le mécanisme. Pour utiliser les termes actuels, le phénotype pourpre est dominant par rapport au phénotype blanc et ce dernier est récessif par rapport au phénotype pourpre. C'est donc le phénotype des individus de la F_1, établi en croisant différentes lignées pures, qui fournit la définition opérationnelle de la dominance : le phénotype de tels individus est par définition le phénotype dominant.

Mendel démontra ensuite que la classe des individus de F_2 arborant le phénotype dominant contenait en fait deux sous-classes génétiquement distinctes. En l'occurrence il suivait le caractère «couleur de la graine». Chez le pois la couleur de la graine est déterminée par la constitution génétique de la graine elle-même et non par celle du parent maternel comme chez certaines espèces de plantes. Ce fait est très commode puisqu'il permet au chercheur de considérer chaque grain de pois comme un individu et d'observer directement son phénotype sans devoir préalablement le laisser germer puis fleurir comme il le faudrait pour pouvoir observer la couleur des fleurs. Il permet aussi d'examiner de grands nombres de descendants et rend plus aisé l'analyse des générations ultérieures. La couleur des graines utilisées par Mendel était soit jaune soit verte. Il croisa entre elles une lignée pure à graines jaunes et une lignée pure à graines vertes et observa que tous les pois de la F_1 étaient jaunes. Symboliquement

P jaune × vert

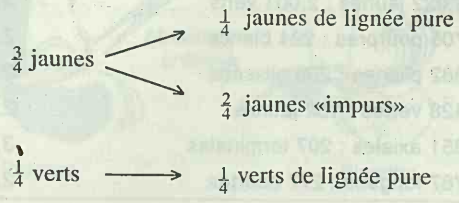
↓

F_1 tous jaunes

Dès lors, par définition, le jaune est le phénotype dominant et le vert est récessif.

Mendel fit pousser une génération de plantes F_1 à partir de ces pois F_1 et les laissa s'autoféconder. Les pois qui se formèrent sur ces plantes représentaient la génération F_2. Il observa que dans les gousses (ou cosses) des plantes F_2 3/4 des pois étaient jaunes et le quart restant verts. Ici aussi les phénotypes de la F_2 se présentent sous un rapport 3 : 1. Mendel prit un échantillon de 519 pois jaunes F_2 et les fit germer. Les plantes F_3 qui en résultèrent furent autofécondées et les pois de chaque couleur à nouveau dénombrés. Mendel trouva que 166 de ces plantes ne portaient que des pois jaunes et que sur chacune des 353 plantes restantes il y avait à la fois des pois jaunes et des pois verts dans le rapport 3 : 1. En outre les plantes obtenues à partir des pois verts F_2 ne produisirent après fécondation que des pois verts. En résumé, tous les pois verts F_2 étaient de lignée pure verte comme la lignée parentale verte mais parmi les jaunes F_2, environ 2/3 étaient semblables aux jaunes F_1

(produisant des graines jaunes et vertes dans un rapport de 3 à 1 après autofécondation) et le 1/3 restant était comme le parent de lignée pure jaune. L'étude de la génération F_3 révélait donc que le rapport de phénotypes 3 : 1 observé chez la F_2 résultait d'un rapport plus fondamental 1 : 2 : 1.



Des études ultérieures établirent que ces rapports 1 : 2 : 1 étaient sous-jacents à tous les cas de rapports de phénotypes que Mendel avait observés. Dès lors, le véritable problème devenait d'expliquer le rapport 1 : 2 : 1.

L'hypothèse que Mendel fournit pour expliquer ces observations est un exemple classique de modèle se prêtant particulièrement bien à l'épreuve de nouvelles expériences. De ses résultats Mendel déduisit l'explication suivante pour le rapport 1 : 2 : 1.

1. Il existe des déterminants héréditaires d'une nature particulaire. (N'observant pas de mélange des phénotypes Mendel était forcé de tirer cette conclusion). Aujourd'hui nous appelons ces déterminants des gènes.
2. Chaque plante de pois adulte possède deux gènes — une **paire de gènes** — dans chaque cellule pour chacun des caractères étudiés. Ici le raisonnement de Mendel est évident ; les plantes de la F_1, par exemple, doivent posséder un gène, appelé le **gène dominant**, responsable du phénotype dominant et un autre gène, appelé le **gène récessif**, responsable du phénotype récessif, celui qui se révèle seulement dans les générations ultérieures.
3. Les membres de chaque paire de gènes se disjoignent (ou ségrègent) de manière égale lors de la formation des gamètes, ou cellules sexuées.
4. Par conséquent chaque gamète ne porte qu'un seul membre de chaque paire de gènes.
5. L'union de deux gamètes parentaux pour former la première cellule (ou zygote) d'un nouveau rejeton est aléatoire ; c'est-à-dire qu'elle n'est pas influencée par la nature du gène porté par le gamète.

Nous avons illustré ces points dans un diagramme de portée générale, désignant (ainsi que le fit Mendel) le gène qui détermine le phénotype dominant par *A* et le gène récessif correspondant par *a*, tout comme un mathématicien utilise des symboles pour représenter des entités abstraites de diverses natures. Ceci est représenté sur la figure 2-6 qui montre comment ces cinq points expliquent le rapport 1 : 2 : 1.

Ce modèle conférait une logique à l'ensemble des résultats. Néanmoins bien des modèles, si séduisants qu'ils fussent, n'ont pas survécu à l'épreuve de l'expérience. Pour Mendel la tâche suivante fut de tester le modèle. A cette fin il croisa une plante F_1 obtenue à partir d'un pois jaune avec une plante obtenue à partir d'un pois vert. On pouvait prévoir que la génération suivante produirait des jaunes et des verts dans le rapport 1 : 1. Si nous désignons par *J* le gène qui détermine le phénotype dominant des graines jaunes et par *j* le gène qui détermine le phénotype récessif

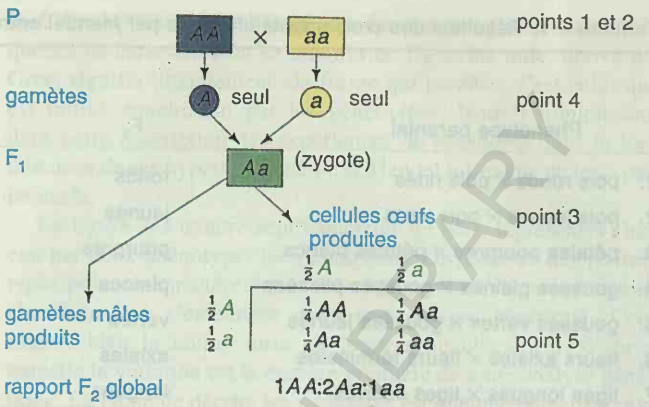


Figure 2-6. Représentation mendélienne des déterminants héréditaires d'une différence de caractère dans les générations P, F_1 et F_2. Les cinq points sont ceux repris dans le texte.

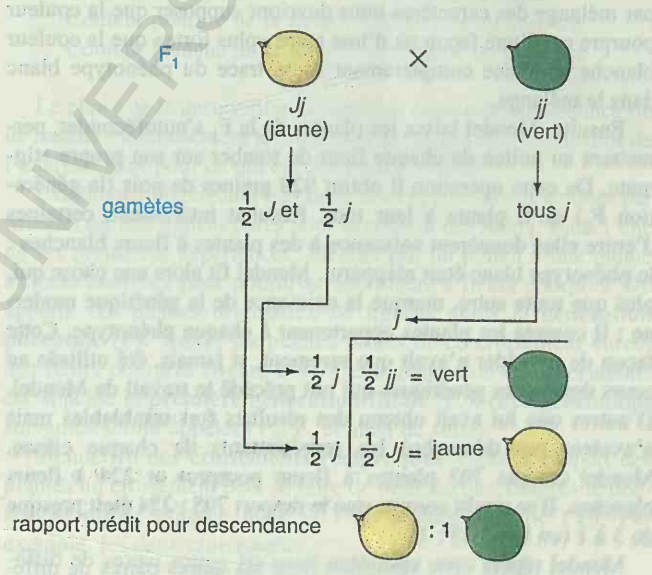


Figure 2-7. Prédictions d'un croisement entre des plants F_1 jaunes et n'importe quel plant vert.

des graines vertes, nous pouvons représenter les prédictions de Mendel par le diagramme de la figure 2-7. Dans cette expérience il obtint 58 jaunes (*Jj*) et 52 verts (*jj*) ; ce résultat était très proche du rapport 1 : 1 prédit et confirmait la ségrégation égale de *J* et de *j* chez les individus de la F_1. C'est ce concept de **ségrégation égale** que l'on reconnaît formellement comme la première loi de Mendel.

Première Loi de Mendel Les deux membres d'une paire de gènes se disjoignent (ou ségrègent) lors de la formation des gamètes, de telle manière qu'une moitié des gamètes portent l'un des membres de la paire et la moitié restante l'autre.

UNIVERSITY LIBRARY

Il nous faut maintenant introduire quelques termes supplémentaires. Les individus désignés comme *Aa* sont appelés **hétérozygotes** ou parfois **hybrides**, tandis que les individus d'une lignée pure sont appelés **homozygotes**. Dans de tels termes «hétéro-» signifie différent et «homo-» identique. Donc une plante *AA* est dite **homozygote dominante** ; une plante *aa* est homozygote pour le gène récessif ou **homozygote récessive**. Comme nous l'avons vu au chapitre 1 la constitution génétique correspondant aux caractères étudiés est appelée le **génotype**. Donc *JJ* et *Jj*, par exemple, sont des génotypes différents même si les graines des deux types ont le même phénotype (jaune en l'occurence). On voit bien par cet exemple que le phénotype peut être considéré simplement comme la manifestation extérieure d'un génotype sous-jacent. Sous-jacent au rapport phénotypique 3 : 1 de la F_2 il y a en réalité un rapport génotypique 1 : 2 : 1 de JJ : Jj : jj.

Notez que sensu stricto les termes «dominant» et «récessif» se rapportent au phénotype. Le phénotype dominant se déduit de l'aspect de la F_1. Il est cependant évident qu'un phénotype (c'est-à-dire une simple description) ne peut réellement exercer une dominance. Mendel a montré que la dominance d'un phénotype sur un autre résulte en fait de la dominance exercée par l'un des membres d'une paire de gènes sur l'autre.

Arrêtons-nous un moment pour bien nous pénétrer de la portée de ce travail. L'apport de Mendel fut de développer un schéma analytique pour l'identification de gènes jouant un rôle important dans l'expression d'un caractère ou d'une fonction. Considérons l'exemple de la couleur des pétales. Partant de deux phénotypes distincts (pourpre et blanc) concernant un seul caractère (la couleur des pétales) il put montrer que cette différence était due à celle qui existe entre les membres d'une paire de gènes. Les généticiens modernes diraient que l'analyse de Mendel a permis d'identifier un gène essentiel (ou majeur) pour la coloration des pétales. Cela veut dire qu'il existe chez ces organismes un gène particulier qui exerce un effet marquant sur la couleur des pétales. Ce gène peut exister sous des formes différentes : la forme dominante du gène (représentée par *C*) détermine des pétales pourpres et sa forme récessive (représentée par *c*) détermine des pétales blancs. Les formes *C* et *c* que l'on appelle **allèles** sont deux formes possibles de ce gène impliqué dans la coloration des pétales. On leur donne la même lettre comme symbole pour indiquer qu'il s'agit de formes du même gène. Nous pourrions exprimer ceci autrement en disant qu'il existe un gène, désigné phonétiquement «sé», avec des allèles *C* et *c*. Chaque plante de pois aura toujours deux gènes «sé», constituant une paire de gènes, et les membres réels de cette paire de gènes pourront être soit *CC*, *Cc* ou *cc*. Bien que les membres d'une paire de gènes puissent produire des effets différents, notez qu'ils affectent tous les deux le même caractère.

L'emploi des termes gène et allèle peut mener à des confusions ; ainsi, afin de clarifier les concepts, anticipons quelque peu et voyons ce qu'ils signifient au niveau de l'ADN. Lorsqu'on examine les séquences d'ADN de deux allèles A et a grâce à la technologie génétique moderne, on constate qu'elles sont le plus souvent identiques à un ou quelques nucléotides près sur les millions dont le gène est constitué. Nous voyons donc que les allèles sont bien réellement des versions différentes du même gène. Nous pourrions aussi considérer le mot gène comme un terme générique et le mot allèle comme un terme spécifique.

Même si les termes dominant et récessif désignent originellement des phénotypes, nous avons vu que ces derniers reflètent en réalité les différents effets de divers allèles. Il est donc légitime d'utiliser les expressions «allèle dominant» et «allèle récessif» comme déterminants de phénotypes dominants et récessifs (notons que ces expressions sont plus correctes que les termes «gène dominant» et «gène récessif», parfois utilisés).

Quelle relation existe-t-il entre la terminologie allélique et le concept de paire de gènes? Une paire de gènes peut consister en allèles identiques (chez des homozygotes) ou différents (chez des hétérozygotes). Lorsque les deux membres d'une paire de gènes ségrègent, ainsi que le décrit la première loi de Mendel, il peut donc s'agir d'allèles identiques (chez des homozygotes) ou différents (chez des hétérozygotes). Bien sûr, seule la ségrégation d'un hétérozygote peut mener à la ségrégation de deux phénotypes différents parmi la descendance.

La démarche fondamentale de l'analyse mendélienne d'un caractère héréditaire est résumée dans le tableau 2-2.

Tableau 2-2. Résumé du mode opératoire à suivre pour établir une hérédité mendélienne simple

Schéma expérimental :
1. Choisir des lignées différant par un caractère (fleurs pourpres ou blanches).
2. Croiser les lignées entre elles.
3. Laisser les individus de la F_1 s'autoféconder.

Résultats : La totalité de la F_1 est pourpre; la F_2 est pour les $\frac{3}{4}$ pourpre et pour $\frac{1}{4}$ blanche.

Déductions :
1. La différence de caractère est contrôlée par un gène majeur pour la coloration des fleurs.
2. L'allèle dominant de ce gène détermine des pétales pourpres ; l'allèle récessif détermine des pétales blancs.

Interprétation symbolique :

Caractère	Phénotypes	Génotypes	Allèles	Gène
Couleur de la fleur	Pourpre (dominant)	*CC* (homozygote dominant)	*C* (dominant)	Gène de la couleur des fleurs
		Cc (hétérozygote)	*c* (récessif)	
	Blanc (récessif)	*cc* (homozygote récessif)		

Message A l'origine, et aujourd'hui encore, c'est la découverte de rapports mathématiques précis dans les générations issues de parents présentant des différences héréditaires qui permit de conclure à l'existence des gènes.

Variétés différant par deux caractères

Dans les expériences décrites jusqu'ici nous nous sommes occupés uniquement de ce qu'on appelle parfois **monohybridisme** (ou croisements monohybrides), ce qui signifie l'appariement de deux lignées pures différant par un gène responsable d'un trait distinctif. Nous pouvons nous demander à présent ce qui se passe en cas de **dihybridisme,** c'est-à-dire quand les lignées pures parentales se distinguent par deux gènes contrôlant des caractères différents. Utilisons le même symbolisme que Mendel pour désigner le génotype de la couleur des graines (*J* et *j*) et de leur forme (*R* et *r*). *R* désigne des graines rondes, *r* des graines ridées. Dans un croisement monohybride, on observe un rapport 3/4 ronds sur 1/4 ridés à la F_2 (figure 2-8).

Après autofécondation, une lignée pure de plantes *RR jj* produira des graines rondes et vertes. Si une autre lignée pure, *rrYY*, est traitée de même elle donnera des graines ridées et jaunes. Lorsque Mendel croisa des plantes de ces deux lignées entre elles il obtint une F_1 à graines rondes et jaunes,comme il s'y attendait. Les résultats de la F_2 sont rassemblés dans la figure 2-9. Mendel fit des expériences semblables avec d'autres paires de caractères dans de nombreux croisements dihybrides ; dans chaque cas, il obtint le rapport 9 : 3 : 3 : 1. Il avait là un nouveau phénomène à expliquer, d'autres nombres à convertir en une idée.

Mendel vérifia d'abord que le rapport obtenu pour chaque paire de gènes dans le croisement dihybride était le même que dans un croisement monohybride. Si vous ne considérez que les phénotypes ronds et ridés et faites le total de toutes les graines tombant dans ces deux classes (voyez la figure 2-9) les totaux sont 315 + 108 = 423 rondes et 101 + 32 = 133 ridées. Dès lors le rapport de monohybridisme 3 : 1 se maintient. Pareillement le rapport graines jaunes/graines vertes est (315 + 101) : (108 +32) = 416 : 140, également proche de 3 : 1. Mendel y vit l'indice que les deux systèmes héréditaires étaient indépendants l'un de l'autre. Il était suffisamment ferré en mathématique pour se rendre compte que le rapport 9 : 3 : 3 : 1 n'était rien d'autre que la combinaison aléatoire de deux rapports 3 : 1 indépendants.

A ce stade il est opportun de présenter quelques règles élémentaires du calcul des probabilités.

1. *Définition de la probabilité*

$$\text{Probabilité} = \frac{\text{Le nombre de cas favorables à l'arrivée d'un événement}}{\text{Le nombre d'occasions qu'il a de se produire (ou le nombre d'essais)}}$$

Par exemple, la probabilité d'obtenir un quatre en un coup de dé lors d'un seul essai s'écrit

$$p(\text{pour un } 4) = \tfrac{1}{6}$$

parce que le dé a six faces. Si chaque face a une chance égale de «sortir», le résultat moyen devrait être un quatre pour chaque série de six coups.

Figure 2-8. Petits pois ronds (*R*-) et ridés (*rr*) dans la cosse d'une plante hétérozygote (*Rr*) autopollinisée. Le rapport des phénotypes s'y trouve être exactement le rapport 3 : 1 que l'on s'attend à trouver en moyenne dans la descendance de ce croisement. (Des études moléculaires récentes ont montré que l'allèle ridé utilisé par Mendel est dû à l'insertion dans le gène *R* d'un des éléments mobiles discutés au chapitre 20). (Madan K. Bhattacharyya).

2. *La règle du produit.* La probabilité que deux événements indépendants se produisent simultanément est le produit de leurs probabilités respectives. Par exemple, si nous jetons deux fois le même dé, nous avons

$$p(\text{pour deux } 4) = \tfrac{1}{6} \times \tfrac{1}{6} = \tfrac{1}{36}$$

3. *La règle de la somme.* La probabilité que se produise *l'un ou l'autre* de deux événements indépendants (donc qui s'excluent mutuellement) est la somme de leurs probabilités individuelles. Par exemple, si nous jetons simultanément deux dés

$$p(\text{deux } 4 \textit{ ou } \text{deux } 5) = \tfrac{1}{36} + \tfrac{1}{36} = \tfrac{1}{18}$$

On peut prévoir la composition de la F_2 d'un croisement dihybride si le mécanisme qui répartit *R* et *r* parmi les gamètes est *indépendant* de celui qui répartit *J* et *j*. La fréquence des types de gamètes peut se calculer en déterminant leurs probabilités respectives à partir des règles que nous venons d'énoncer. Donc si vous prenez un gamète au hasard, *la probabilité* de saisir un gamète d'un certain type est la même que la fréquence de ce type de gamète.

D'après la première loi de Mendel nous savons qu'un hétérozygote produit des gamètes dans les proportions suivantes :

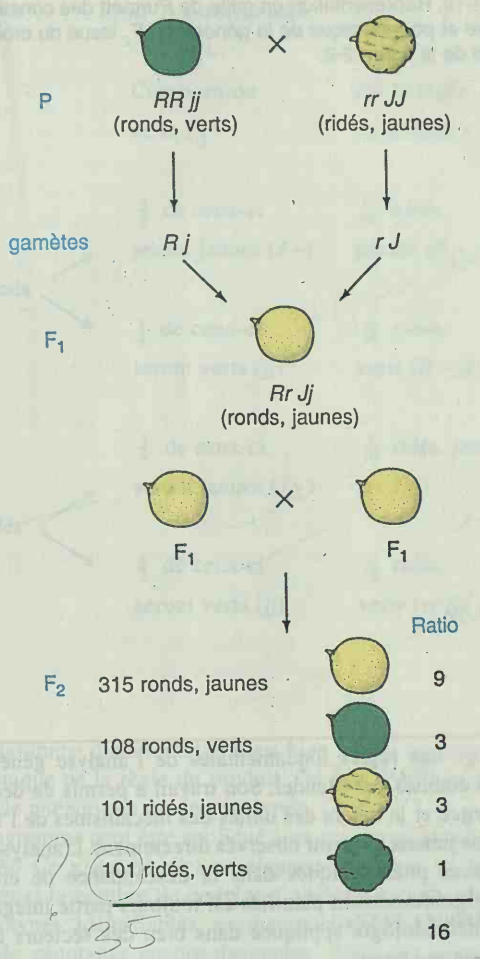


Figure 2-9. La génération F_2 résultant d'un croisement dihybride.

gamètes J = gamètes $j = \frac{1}{2}$

gamètes R = gamètes $r = \frac{1}{2}$

Une plante *RrJj* produit quatre types de gamètes. La probabilité qu'un gamète porte *R* et *J* s'écrit *p(RJ)*. De même, *p(Rj)* dénote qu'un gamète porte simultanément *R* et *j*. En supposant que la ségrégation de *R* ou *r* dans un gamète est indépendante de celle de *J* ou *j* dans le même gamète, nous pouvons utiliser la règle du produit pour calculer la probabilité de chaque combinaison gamétique :

$$p(RJ) = \tfrac{1}{2} \times \tfrac{1}{2} = \tfrac{1}{4}$$

$$p(Rj) = \tfrac{1}{2} \times \tfrac{1}{2} = \tfrac{1}{4}$$

$$p(rj) = \tfrac{1}{2} \times \tfrac{1}{2} = \tfrac{1}{4}$$

$$p(rJ) = \tfrac{1}{2} \times \tfrac{1}{2} = \tfrac{1}{4}$$

Dès lors nous pouvons représenter la génération F_2 par une «grille de Punnett» (pour citer son inventeur), comme on peut le voir dans la figure 2-10. Les colonnes de la grille représentent les contributions des parents mâles à la F_2 et les rangées celles des parents femelles.

La probabilité d'1/16 indiquée dans chaque case de la grille s'obtient également par la règle du produit. La composition du zygote dérive de deux événements indépendants, ceux qui produisent respectivement les gamètes mâle et femelle. Par exemple, la probabilité (ou fréquence) des zygotes *RR JJ* (combinant un gamète mâle *RJ* avec un gamète femelle *RJ*) sera 1/4 × 1/4 = 1/16. Regroupant tous les types offrant la même physionomie (tels qu'ils sont répertoriés dans la figure 2-9), nous aboutissons au rapport 9 : 3 : 3 : 1. Le mystère fait place à la pureté du nombre.

ronds, jaunes	$\frac{9}{16}$ ou 9
ronds, verts	$\frac{3}{16}$ ou 3
ridés, jaunes	$\frac{3}{16}$ ou 3
ridés, verts	$\frac{1}{16}$ ou 1

Le concept d'indépendance des ségrégations alléliques de deux gènes différents est capital. Ce concept d'**assortiment indépendant** fut généralisé sous la forme d'un énoncé que l'on considère aujourd'hui comme la deuxième loi de Mendel.

Deuxième Loi de Mendel Pendant la formation des gamètes, la ségrégation des allèles d'un gène donné s'opère indépendamment de celle des allèles d'un autre gène

Un avertissement cependant : nous verrons plus tard qu'un phénomène appelé liaison génétique constitue une exception importante à la deuxième loi de Mendel. Celle-ci ne s'applique en effet qu'aux gènes situés sur des chromosomes différents ou très éloignés l'un de l'autre sur le même chromosome (voir chapitre 5).

Notez comment les comptages de Mendel ont mené à la découverte de régularités inattendues telles le rapport 9 : 3 : 3 : 1 et combien un petit nombre d'hypothèses (telles la ségrégation au hasard et l'assortiment indépendant) peuvent expliquer ce rapport à première vue si déconcertant. Bien qu'on ne s'en soit pas rendu compte à l'époque, l'approche de Mendel devait donner la clef qui permettrait de comprendre les mécanismes génétiques.

Naturellement, Mendel entreprit de mettre sa deuxième loi à l'épreuve. Par exemple, il croisa entre eux un dihybride de F_1 *Rr Jj* avec un double homozygote récessif *rr jj*. Un croisement avec un homozygote récessif est actuellement dénommé **croisement test**. Les croisements tests permettent à l'expérimentateur de déterminer le génotype sous-jacent à un phénotype dominant car l'homozygote récessif n'apporte que des allèles récessifs à la descendance. Nous reverrons souvent ce type de croisement dans ce livre. Pour son croisement test, Mendel prévoyait que le dihybride *Rr Jj* produirait les types gamétiques *RJ*, *Rj*, *rj* et *rJ* avec une égale fréquence — c'est-à-dire 1/4, 1/4, 1/4 et 1/4 comme on peut le voir sur chaque côté de la grille de Punnett représentée sur la figure 2-10. D'autre part, puisque la souche test est homozygote, le plant *rr jj* ne devait produire qu'un seul type de gamètes (*rj*). Par conséquent les phénotypes des descendants devaient refléter directement les types gamétiques du parent *Rr Jj* (en effet la contribution récessive *r j* du parent *rr jj* ne modifie pas le phénotype apporté par l'autre gamète). Mendel prévoyait donc que les descendants du croisement test, *Rr Jj*, *Rr jj*, *rr jj* et *rr Jj*, apparaîtraient dans le rapport 1 : 1 : 1 : 1 et sa prévision s'avéra correcte. Il soumit à une épreuve intensive le concept de l'assortiment indépendant en étudiant le comportement de quatre paires de gènes différentes et trouva qu'il s'appliquait à chaque combinaison.

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

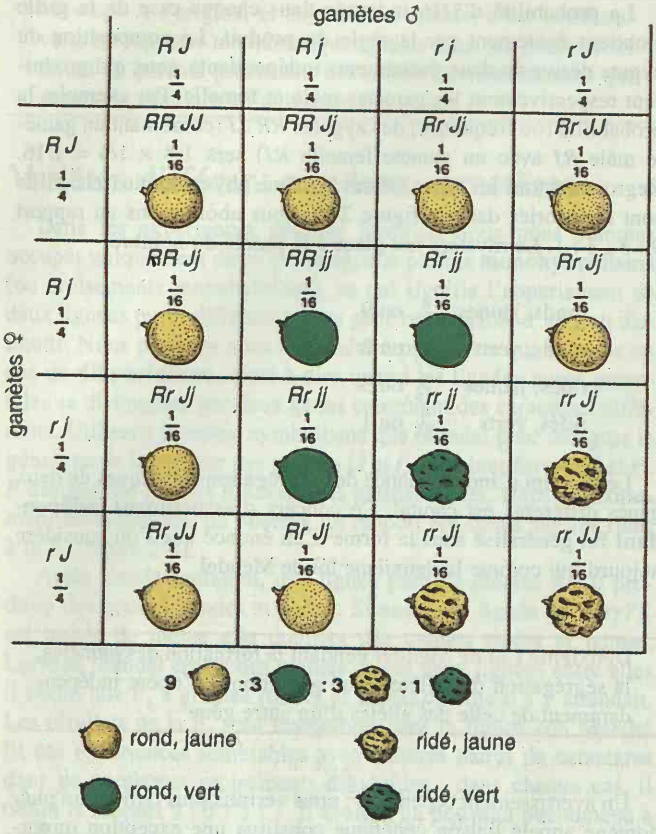


Figure 2-10. Représentation en grille de Punnett des constitutions génétique et phénotypique de la génération F_2 issue du croisement dihybride de la figure 2-9.

Message Les règles fondamentales de l'analyse génétique ont été établies par Mendel. Son travail a permis de déduire l'existence et la nature des unités des mécanismes de l'hérédité sans jamais les avoir observés directement. L'analyse des fréquences phénotypiques dans la descendance de croisements rigoureusement planifiés est toujours partie intégrante de la méthodologie appliquée dans bien des secteurs de la génétique moderne.

Quelles sont alors les structures ou les forces responsables de la ségrégation égale et de l'assortiment indépendant, que nous venons de voir avancer comme concepts abstraits permettant d'expliquer les faits observés ? L'idée de la ségrégation égale suggère que les deux allèles d'un gène coexistent en une configuration ordonnée de laquelle ils peuvent ségréger régulièrement pendant la formation des gamètes. Si les allèles d'un autre gène se comportent de la même manière mais indépendamment de la première, nous obtenons l'assortiment indépendant. A ce stade de notre discussion, il ne s'agit encore que de conjectures, tout comme ce fut le cas après la redécouverte du travail de Mendel. Les mécanismes réels sont à présent connus et au chapitre 3 nous verrons que c'est la localisation des gènes sur les chromosomes qui est la cause de leur ségrégation égale et de l'assortiment indépendant.

Méthodes de calcul des rapports génétiques

Arrêtons nous pour parler du calcul des rapports phénotypiques et génotypiques. La représentation sous forme de grille est sûre et parle aux yeux mais elle est pesante ; elle convient bien pour l'illustration, non pour un calcul efficace.

Pour résoudre certains problèmes un diagramme dichotomique peut être utile. Par exemple, le rapport phénotypique 9 : 3 : 3 : 1 peut être obtenu en représentant chaque alternative par une fourche (ou diagramme dichotomique) et en appliquant la règle du produit pour déterminer les fréquences. (Notez la convention d'après laquelle *R* – représente aussi bien *RR* que *Rr* ; c'est-à-dire que chacun des deux allèles peut occuper la place du trait).

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

F_1 *Rr Jj* autofécondée

↓

	Composition de la F_2	Par la règle du produit
$\frac{3}{4}$ ronds ($R-$)	$\frac{3}{4}$ de ceux-ci seront jaunes ($J-$)	$\frac{9}{16}$ ronds, jaunes ($R-J-$)
	$\frac{1}{4}$ de ceux-ci seront verts (jj)	$\frac{3}{16}$ ronds, verts ($R-jj$)
$\frac{1}{4}$ ridés (rr)	$\frac{3}{4}$ de ceux-ci seront jaunes ($J-$)	$\frac{3}{16}$ ridés, jaunes ($rr\,J-$)
	$\frac{1}{4}$ de ceux-ci seront verts (jj)	$\frac{1}{16}$ ridés, verts ($rr\,jj$)

Le diagramme dichotomique n'est bien sûr qu'une représentation graphique de la règle du produit. On peut l'utiliser pour des rapports de phénotypes ou de génotypes.

Le diagramme peut être appliqué à un cas de trihybridisme (tel que *Aa Bb Cc* × *Aa Bb Cc*) en ajoutant une série de fourches. Cependant si le nombre de couples d'allèles s'accroît, le nombre de phénotypes identifiables augmente considérablement et le nombre de génotypes encore davantage. Avec des classes aussi nombreuses, même la méthode dichotomique devient lourde.

Dans de tels cas nous devons recourir à des procédés basés directement sur les règles du produit et de la somme. Par exemple quelle est la fraction de la descendance du croisement

Aa Bb Cc Dd Ee Ff × *Aa Bb Cc Dd Ee Ff*

qui sera *AA bb Cc DD ee Ff* ? On obtient aisément la réponse si ces paires de gènes se réassortissent toutes de manière indépendante et permettent ainsi d'appliquer la règle du produit. Donc 1/4 des descendants seront *AA*, 1/4 *bb*, 1/2 *Cc*, 1/4 *DD*, 1/4 *ee* et 1/2 *Ff* ; dès lors nous obtenons la réponse en calculant le produit de ces fréquences :

$$p(AA\ bb\ Cc\ DD\ ee\ Ff) = 1/4 \times 1/4 \times 1/2 \times 1/4 \times 1/4 \times 1/2$$
$$= 1/1024$$

Revenons au travail de Mendel. Losque ses résultats furent redécouverts en 1900, ses principes furent mis à l'épreuve chez un large éventail d'organismes eucaryotes (organismes possédant des cellules pourvues de noyaux). Les résultats de ces expériences démontrèrent que les principes établis par Mendel sont généralement applicables. Des rapports mendéliens (tels que 3 : 1, 1 : 1, 9 : 3 : 3 : 1 et 1 : 1 : 1 : 1) ont été trouvés dans de très nombreux cas (figure 2-11), suggérant que la ségrégation égale et l'assortiment indépendant sont des processus héréditaires fondamentaux agissant partout dans la nature. Les lois de Mendel ne concernent pas seulement les petits pois, ce sont des lois générales de la génétique des eucaryotes. L'approche expérimentale utilisée par Mendel est très largement applicable aux plantes. Cependant, chez certaines d'entre elles, ainsi que chez la plupart des animaux, la technique de l'autofécondation n'est pas praticable. On peut contourner ce problème en croisant entre eux des génotypes identiques. Par exemple, les individus d'une F_1 animale résultant de l'accouplement de parents appartenant à des lignées pures différentes peuvent être croisés avec leurs frères ou sœurs de la même F_1 afin d'obtenir une F_2. Comme les individus de la F_1 sont identiques pour ce qui est des gènes en question, le croisement intra-F_1 équivaut à une autofécondation.

BCU IASI / CENTRALA

Figure 2-11. Un rapport 9 : 3 : 3 : 1 de phénotypes de grains de maïs. Chaque grain représente un descendant. La descendance provient de l'autofécondation d'un individu au génotype *Aa Bb*, où *A* = violet, *a* = jaune, *B* = lisse et *b* = ridé. (Anthony Griffiths)

Cas simples de génétique mendélienne chez l'homme

Dans certains systèmes biologiques l'application de la méthodologie mendélienne pose des problèmes particuliers. L'un des plus difficiles bien que des plus intéressants est l'espèce humaine. De toute évidence l'union ne peut s'y pratiquer sous la contrainte de telle sorte que les généticiens doivent recourir à l'examen minutieux de progénitures existantes dans l'espoir que les unions les plus informatives se soient produites plus ou moins au hasard. Cet examen est appelé **analyse généalogique**. Le premier membre d'une famille à retenir l'attention d'un généticien est appelé le **propositus**. Dans la plupart des cas le phénotype du propositus est exceptionnel (par exemple le propositus pourrait être un nain). L'investigateur retrace alors le cheminement de ce trait au long de l'histoire de la famille et établit un arbre généalogique en utilisant des symboles conventionnels repris dans la figure 2-12, (nous expliquerons plus tard les termes «autosomique» et «lié au sexe») ; nous les avons inclus pour que la liste soit complète).

De nombreuses paires de phénotypes humains opposés sont déterminées par des paires d'allèles dont la transmission s'opère de la même manière que chez les pois de Mendel. L'analyse généalogique peut révéler de tels modes de transmission, mais les indices généalogiques doivent être traités de manière différente suivant que l'un des phénotypes contrastants soit une anomalie rare ou que les deux phénotypes mis en relation appartiennent à la variation normale. Ces deux cas sont considérés séparément dans les sections suivantes.

La génétique médicale

La médecine s'occupe des dysfonctionnements de l'être humain ; nombre d'entre eux sont transmis comme phénotypes dominants ou récessifs suivant un mode mendélien simple. En général le propositus, premier indice de l'anomalie, est un individu que le médecin voit pour la première fois comme patient. Si l'anomalie est déjà connue dans sa famille, la généalogie en est alors retracée sur la base des informations disponibles puis analysée.

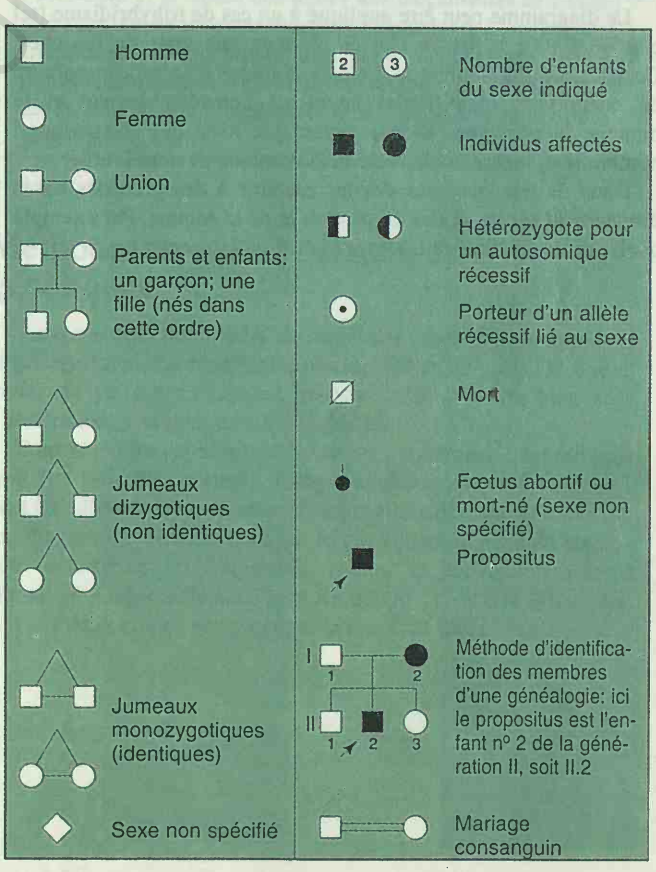
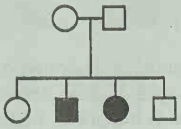


Figure 2-12. Symboles utilisés dans l'analyse des généalogies humaines. (D'après W.F. Bodmer et L.L. Cavalli-Sforza, *Genetics, Evolution, and Man.* Copyright © 1976 par W.H. Freeman and Company.)

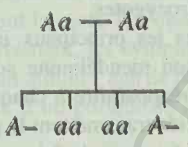
CSU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Considérons tout d'abord la transmission de phénotypes récessifs.

Une affection de type récessif étant déterminée par un allèle récessif, le phénotype normal correspondant l'est par un allèle dominant. Par exemple, la maladie humaine appelée phénylcétonurie (PCU) se transmet de façon mendélienne comme phénotype récessif, la PCU étant déterminée par un allèle *p* et l'état normal par *P*. Les personnes affectées par cette maladie ont donc le génotype *pp* et celles qui n'en souffrent pas sont soit *PP* soit *Pp*. Quel type de filiation généalogique permettrait-il de déceler ce caractère ? Les deux indices clefs sont que la maladie apparaît généralement dans la descendance de parents non affectés et que, chez les descendants qui le sont, on retrouve des personnes des deux sexes. Sachant que les descendants des deux sexes peuvent être affectés nous pouvons considérer que nous avons affaire à une transmission héréditaire de type mendélien simple et non à un cas particulier d'hérédité liée au sexe tel que nous en discuterons au chapitre 3. La généalogie suivante est un exemple typique d'une situation où des enfants affectés naissent de parents sains :



De ce schéma nous pouvons conclure sans détour à la simple transmission mendélienne de l'allèle récessif responsable du phénotype anormal (indiqué en plein). En outre nous en déduisons que les parents sont tous deux hétérozygotes, de type *Aa* : l'un comme l'autre doivent posséder un allèle *a* puisque tous deux en apportent un exemplaire à chacun des deux enfants et tous deux doivent posséder un allèle A puisqu'ils sont phénotypiquement normaux. Nous pouvons maintenant désigner les génotypes des enfants (dans l'ordre représenté) comme *A-*, *aa*, *aa* et *Aa*. La généalogie devient donc



Notons une autre caractéristique intéressante de l'analyse généalogique familiale : bien que les lois de Mendel y soient d'application, les rapports mendéliens n'y sont que rarement observés du fait de la petitesse de l'échantillon. Dans l'exemple ci-dessus nous observons un rapport phénotypique 1 : 1 dans la descendance d'un croisement monohybride. Si le couple avait 20 enfants le rapport pourrait être, par exemple, de 15 enfants non atteints à 5 affectés de PCU (donc un rapport 3 : 1) mais, au sein d'un échantillon de quatre, tous les rapports sont possibles et d'ailleurs observés.

Les généalogies d'affections récessives ne les font apparaître que de loin en loin, avec peu de symboles en plein. Une condition récessive se manifeste par groupes de descendants affectés au sein d'une même génération alors que les personnes des générations antérieures et ultérieures ont tendance à ne pas être touchées. Pour en comprendre la raison il faut se rendre compte de ce qu'est la structure génétique des populations porteuses de telles affections rares. En effet si l'affection est rare, la plupart des personnes ne possèdent pas l'allèle anormal. De plus, la plupart de celles qui le possèdent sont hétérozygotes. La raison pour laquelle les hétérozygotes sont beaucoup plus fréquents que les homozygotes récessifs est que les deux parents d'un tel homozygote doivent porter l'allèle *a* alors qu'un seul parent porteur suffit pour procréer un hétérozygote.

Les généticiens peuvent exprimer de manière quantitative la relation entre la rareté d'un allèle et la fréquence des hétérozygotes et homozygotes au sein d'une population. Ils obtiennent les fréquences relatives des génotypes qui composent une population en posant que celle-ci est dans l'état d'équilibre défini par Hardy-Weinberg, que nous discuterons en détail au chapitre 26. Si nous faisons cette supposition simplificatrice, et si les proportions relatives des allèles *A* et *a* au sein d'une population sont respectivement *p* et *q*, les fréquences des trois génotypes possibles sont p^2 pour *AA*, $2pq$ pour *Aa* et q^2 pour *aa*. Illustrons cela par un exemple numérique. Si nous posons que *q*, la fréquence d'un allèle récessif provoquant une maladie est de 1/50, *p* est alors 49/50 et la fréquence des homozygotes touchés par l'affection est $q^2 = (1/50)^2 = 1/2500$, tandis que la fréquence des hétérozygotes est $2pq = 2 \times 49/50 \times 1/50$ = approximativement 1/25. Dans cet exemple-ci nous voyons donc que les hétérozygotes sont 100 fois plus fréquents que les individus affectés. Au plus rare est l'allèle, au plus grand est le rapport.

L'apparition d'un individu affecté dépend habituellement de l'union fortuite de deux hétérozygotes non apparentés. La pratique de croisements consanguins accroît le risque qu'une union se produise entre hétérozygotes. La figure 2-13 donne un exemple de

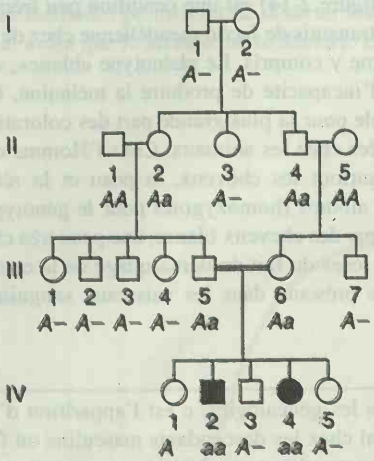


Figure 2-13. Exemple de généalogie impliquant un phénotype récessif exceptionnel déterminé par l'allèle récessif *a*. D'ordinaire les symboles génétiques ne sont pas mentionnés sur les tableaux généalogiques mais les génotypes sont indiqués ici à titre de référence. Notez que les individus II.1 et II.5 se sont introduits dans la famille par mariage ; on les suppose normaux parce que l'anomalie héréditaire examinée est ordinairement rare. Notez aussi qu'il n'est pas possible de certifier le génotype de certains individus au phénotype normal. De tels individus sont désignés par *A–*.

mariage entre cousins. Vous pouvez en déduire qu'un ancêtre hétérozygote peut produire de nombreux descendants qui le sont également. Par conséquent, les unions entre individus apparentés font courir un risque plus élevé de produire des individus au phénotype anormal dus à l'homozygotie pour un allèle récessif, que des unions entre personnes non apparentées. C'est pour cette raison que les mariages entre cousins au premier degré produisent une proportion importante d'individus affectés de maladies récessives au sein d'une population.

Donnons quelques exemples d'affections récessives chez l'homme. Nous avons déjà mentionné la PCU dans une analyse généalogique ; quel en est le phénotype ? La PCU est une maladie due au fait que le corps ne plus métaboliser normalement l'acide aminé phénylalanine, un composant de toutes les protéines que contient notre nourriture. Cette substance s'accumule alors et est transformée en acide phénylpyruvique qui contrecarre le développement du système nerveux, ce qui provoque un retard mental. Actuellement les bébés subissent des tests de routine pour détecter cette anomalie à la naissance. Si celle-ci est détectée, l'accumulation de phénylalanine peut être contenue par un régime spécial et le développement de la maladie est arrêté.

La fibrose cystique est une autre maladie héréditaire transmise de façon mendélienne en tant que phénotype récessif. Cette maladie a récemment suscité beaucoup d'attention du fait que l'allèle responsable en a été isolé en 1989 et la séquence de son ADN déterminée. On a donc pu comprendre la fonction du gène chez les individus normaux et affectés, ce qui permet d'espérer la mise au point d'un traitement plus efficace qu'actuellement. La fibrose cystique est une affection dont le symptome majeur est la sécrétion de mucus en quantités importantes dans les poumons, ce qui provoque la mort par une combinaison d'effets ; l'issue fatale est généralement précipitée par une infection des voies respiratoires supérieures. Le mucus peut être délogé par une succession de petits chocs sur la poitrine et l'infection pulmonaire prévenue par des antibiotiques ; ces traitements permettent aux patients atteints de fibrose cystique d'atteindre l'âge adulte.

L'albinisme (figure 2-14) est une condition peu fréquente dont le phénotype est transmis de façon mendélienne chez de nombreux animaux, l'Homme y compris. Le phénotype «blanc», assez frappant, résulte de l'incapacité de produire la mélanine, le pigment qui est responsable pour la plus grande part des colorations noires et brunes observées chez les animaux. Chez l'Homme ces colorations marquent surtout les cheveux, la peau et la rétine ; leur absence chez les albinos (homozygotes pour le génotype récessif *aa*) se manifeste par des cheveux blancs, une peau très claire et des pupilles qui sont roses du fait du démasquage de la couleur rouge de l'hémoglobine présente dans les vaisseaux sanguins qui irriguent la rétine.

Message Dans les généalogies, c'est l'apparition d'un phénotype anormal chez les descendants masculins ou féminins d'individus non touchés qui révèle la transmission mendélienne d'une anomalie récessive.

Qu'en est-il des anomalies qui constituent des caractères dominants ? Ici, c'est l'allèle normal qui est récessif et l'anormal qui domine. Il peut sembler paradoxal qu'une anomalie rare puisse être dominante mais rappelons-nous que la dominance et la récessivité reflètent simplement la manière dont l'allèle agit et ne sont aucunement définis en terme de prédominance dans la population.

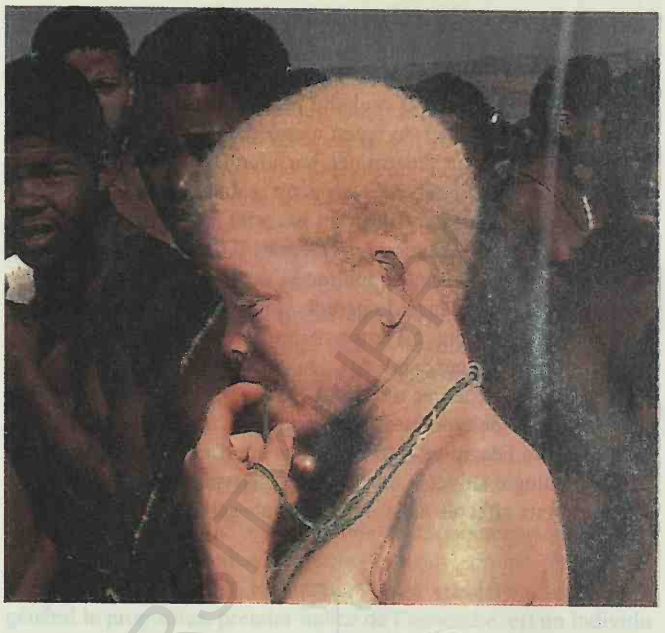


Figure 2-14. Cas d'albinisme. Le phénotype est dû à l'homozygotie pour un allèle récessif, soit *aa*. L'allèle dominant *A* détermine une étape dans la synthèse de la mélanine, pigment brun foncé des cellules de la peau, des poils et de la rétine. Chez les individus *aa* cette étape n'est pas fonctionnelle et la synthèse de la mélanine bloquée. (Yves Gellie/ Icône).

Un bon exemple de phénotype dominant et rare transmis de façon mendélienne est l'achondroplasie, une sorte de nanisme (voir la figure 2-15). Dans ce cas, les personnes de stature normale sont de génotype *dd* et celui du phénotype nain peut être *Dd* ou *DD*. On pense cependant que la présence de deux «doses» de l'allèle *D* chez des individus *DD* provoque des effets tellement sévères que ce génotype est létal. S'il en est bien ainsi, tous les achondroplasiques doivent être hétérozygotes.

Dans les généalogies les principaux indices d'une anomalie dominante à transmission mendélienne sont la tendance que le phénotype manifeste à réapparaître à chaque génération et le fait que pères et mères affectés transmettent le phénotype à leurs filles comme à leurs garçons. Ici aussi, le fait que les deux sexes soient représentés parmi les descendants affectés exclut l'éventualité d'une anomalie liée au sexe déjà mentionnée dans notre discussion des anomalies récessives. Le phénotype se manifeste à chaque génération du fait que, généralement, l'allèle anormal porté par un individu donné doit provenir d'un parent de la génération précédente. Des allèles anormaux peuvent survenir de novo par un changement génétique appelé mutation. Ce phénomène est rare mais constitue une possibilité de principe à ne pas perdre de vue. Une généalogie caractéristique d'une anomalie dominante est présentée dans la figure 2-16. Ici aussi, observons que les rapports observés au sein des familles ne sont nécessairement mendéliens. Comme dans le cas des anomalies récessives les individus porteurs d'un seul exemplaire de l'allèle rare (*Aa*) sont beaucoup plus fréquents que ceux qui en portent deux (*AA*) ; la plupart des personnes affectées sont en effet hétérozygotes et pratiquement toutes les unions impliquant des anomalies dominantes sont du type $Aa \times aa$. Par conséquent, lorsqu'on totalise les descendants de telles unions, on s'attend à trouver un rapport 1 : 1 entre les individus non touchés (*aa*) et ceux qui le sont (*Aa*).

Figure 2-15. Le phénotype de l'achondroplasie humaine, illustré par une famille de cinq soeurs et deux frères. Le phénotype est dû à un allèle dominant, que appellerons *D*, qui interfère avec la croissance des os au cours du développement. La plupart des hommes sont *dd*. Cette photographie fut prise lors de l'arrivée de cette famille en Israël après la fin de la seconde guerre mondiale. (UPI/Bettmann News Photos).

La maladie de Huntington est un exemple d'affection transmise de façon mendélienne comme phénotype dominant. Il s'agit de dégénérescence du système nerveux menant à des convulsions et entraînant prématurément la mort. Il s'agit cependant d'une maladie qui se déclare tardivement, les symptomes n'apparaissant pas avant que l'individu n'ait atteint l'âge de procréer (voir la figure 2-17). Un enfant sur deux d'un porteur de l'allèle anormal court le risque d'en hériter et de contracter la maladie qui lui est associée. Cette situation tragique a suscité d'importants efforts pour mettre au point des méthodes permettant de détecter les porteurs de l'allèle anormal avant que la maladie ne se déclare. La mise en oeuvre

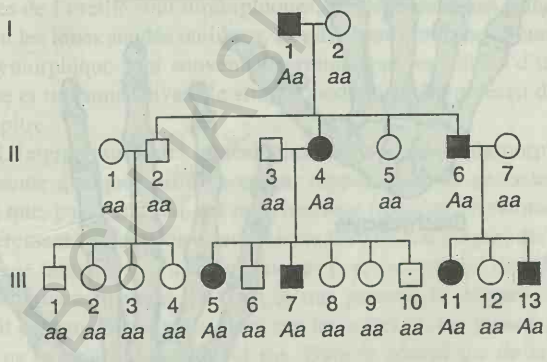


Figure 2-16. Exemple de généalogie impliquant un phénotype dominant exceptionnel déterminé par l'allèle mendélien dominant *A*. Dans cette généalogie il est possible de déduire la plupart des génotypes.

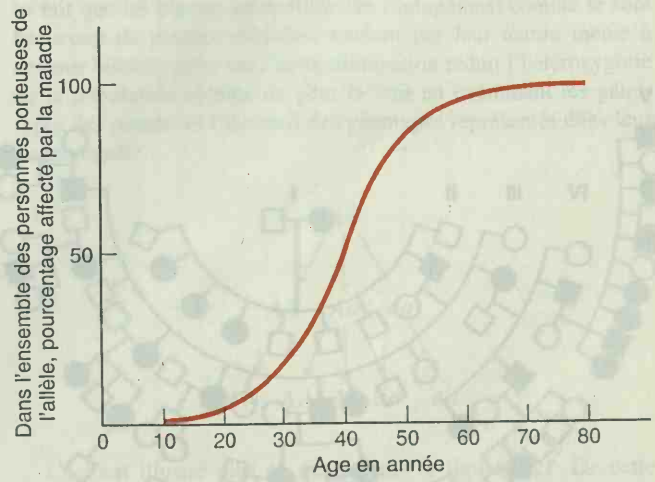
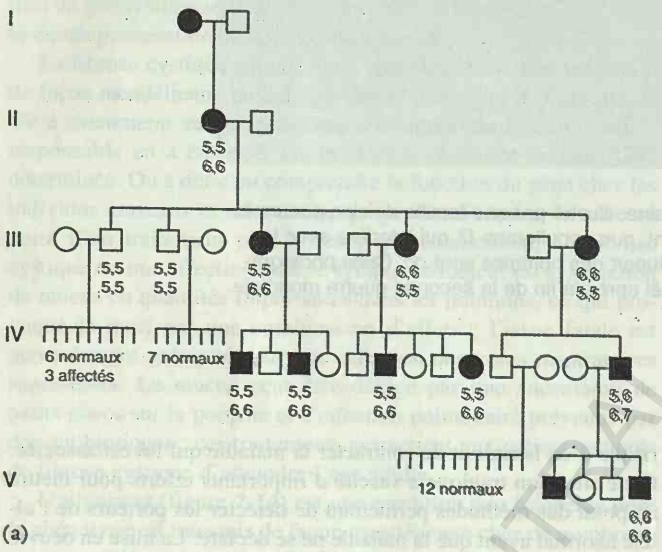
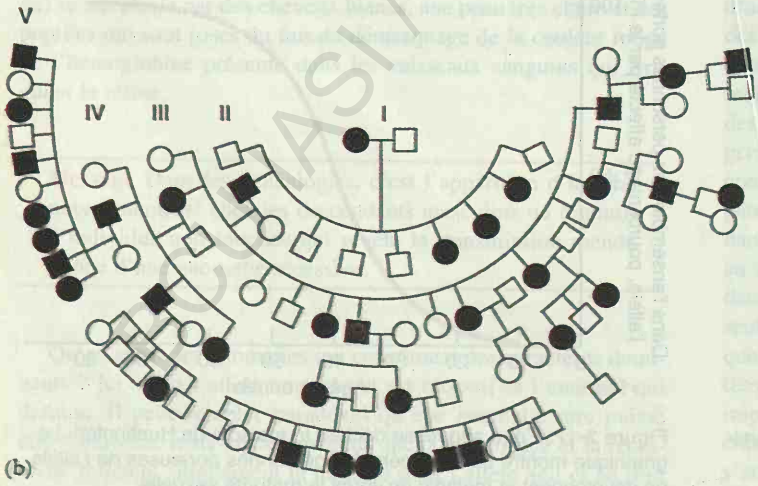
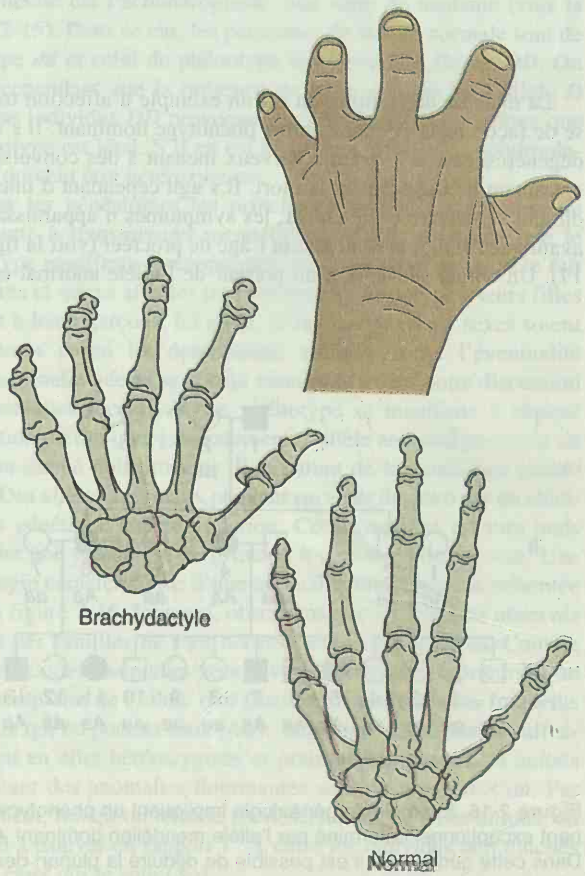


Figure 2-17. L'âge auquel se déclare la maladie de Huntington. Le graphique montre qu'en général les personnes porteuses de l'allèle ne développent la maladie qu'après la maturité sexuelle.

Figure 2-18. Quelques phénotypes humains dominants peu fréquents qui affectent la main. (a) (*en haut*) La polydactylie, caractérisée par des doigts et/ou des orteils surnuméraires et déterminée par un allèle *P*. Les nombres repris dans la généalogie donnée en-dessous indiquent le nombre de doigts dans la ligne du dessus et celui des orteils dans la ligne du dessous. (Noter la variation qui affecte l'expression de l'allèle *P*, une question que nous examinerons plus particulièrement au chapitre 4). (b) (*à droite*) La brachydactylie, phénotype aux doigts courts déterminée par un allèle *B*. Noter les phalanges très courtes par rapport à celles d'une main normale. La généalogie d'une famille atteinte de brachydactylie est typique d'une condition dominante et rare (*à gauche*). Tous les individus affectés sont *Bb* et tous les individus normaux *bb*. (a, photo : Lester Bergmann et Assoc. ; b, d'après C. Ster, *Principles of Human Genetics*, 3ème éd., copyright © 1973 par W.H. Freeman et cie).







de techniques moléculaires a permis de mettre au point une méthode de dépistage prometteuse.

D'autres conditions dominantes peu fréquentes sont la polydactylie (doigts surnuméraires) et la brachydactylie (doigts trop courts), illustrées toutes deux sur la figure 2-18, et la bigarrure de la peau, montrée sur la figure 2-19.

Message Les généalogies d'affections dominantes à transmission mendélienne comportent des individus atteints dans chaque génération ; en outre les hommes et les femmes affectés transmettent la condition à leurs fils et à leurs filles dans des proportions égales.

Variation phénotypique normale

Toutes les populations végétales et animales montrent de la variation et les populations humaines ne font pas exception. Comme les populations isolées subissent une dérive génétique, une partie de la variation observée chez l'homme correspond à des différences ethniques. Nous savons tous, cependant, qu'au sein même de groupes ethniques il existe une variation très importante, celle qui nous permet en fait de nous distinguer les uns des autres. La variation normale est soit continue soit discontinue.

La variation continue affecte des caractères mesurables tels que la taille ou le poids, pour lesquels les phénotypes se distribuent en un spectre continu. L'analyse de ce type de variation requiert des techniques particulières que nous discutons au chapitre 26. Par contre, les caractères à variation discontinue se laissent classifier en phénotypes distincts, comme ceux que Mendel analysa. Il existe chez l'Homme de nombreux exemples de caractères discontinus, tels que les yeux bruns ou bleus, les cheveux noirs ou blonds, la présence ou l'absence d'une fossette au menton, la présence ou l'absence d'une touffe de cheveux en V sur le front, les lobes auriculaires soudés ou non etc. Avant d'examiner une généalogie, introduisons ici un nouveau terme utile. L'existence de deux ou plusieurs phénotypes normaux et courants affectant un caractère est qualifiée de **polymorphisme**, un terme dérivé du grec et indiquant une pluralité de formes. Les différents phénotypes s'appellent des «morphes». Nous examinerons principalement des exemples de paires de morphes bien distincts ; il s'agit donc du polymorphisme le plus simple possible, ou dimorphisme. Nous référant à l'un des exemples cités plus haut nous dirions que les lobes de l'oreille sont dimorphiques, les deux morphes principaux étant les lobes soudés ou libres. Les différents morphes d'une série polymorphique sont souvent déterminés par les allèles d'un seul gène et transmis suivant le simple mode mendélien décrit dans ce chapitre.

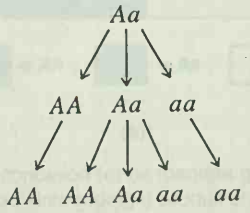
L'interprétation des généalogies de caractères polymorphiques présente quelques différences par rapport aux cas précédents du fait que, par définition, les morphes sont fréquents. Examinons un intéressant exemple de dimorphisme humain. La plupart des populations humaines sont dimorphiques pour la capacité de goûter la phénylthiocarbamide (PTC). Les uns peuvent la déceler par son goût désagréable et amer alors que les autres, à leur grande surprise, ne la goûtent absolument pas. Dans la généalogie de la figure 2-20 nous voyons que deux goûteurs de PTC engendrent parfois des enfants non goûteurs, ce qui montre bien que l'allèle conférant la capacité de déceler la substance est dominant. Notons que presque toutes les personnes qui épousent des membres de cette famille portent l'allèle récessif soit à l'état hétérozygote soit à l'état homozygote. Une telle généalogie diffère donc de celles d'anomalies récessives et peu fréquentes où l'on suppose généralement que tous ceux qui rejoignent la famille sont des homozygotes normaux. Comme les deux allèles PTC sont répandus il n'est pas surprenant que tous les membres de cette famille sauf un aient épousé des porteurs de l'allèle récessif.

Le polymorphisme est un phénomène génétique intéressant. Les généticiens des populations ont été surpris de constater combien le polymorphisme est répandu dans les populations naturelles de plantes et d'animaux. De plus, même si l'analyse génétique des polymorphismes se fait sans difficultés, il n'existe que très peu de cas où l'on ait expliqué de manière satisfaisante la coexistence des morphes. Néanmoins, le polymorphisme est présent à tous les niveaux de l'analyse génétique, celui de l'ADN compris et, de fait, les polymorphismes rencontrés dans la séquence même de l'ADN ont fourni des repères d'une grande utilité dans l'exploration des chromosomes d'organismes supérieurs.

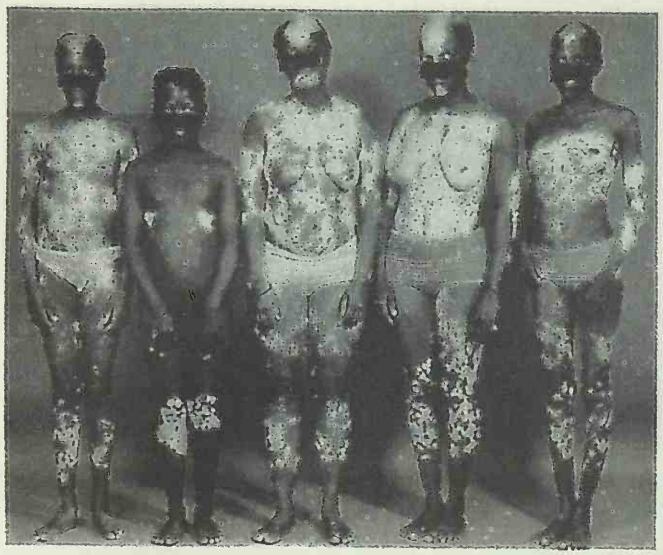
Message Les populations de plantes et d'animaux (l'Homme y compris) sont hautement polymorphiques. Les différents morphes d'un caractère sont généralement déterminés par des allèles dont la transmission suit le simple mode mendélien.

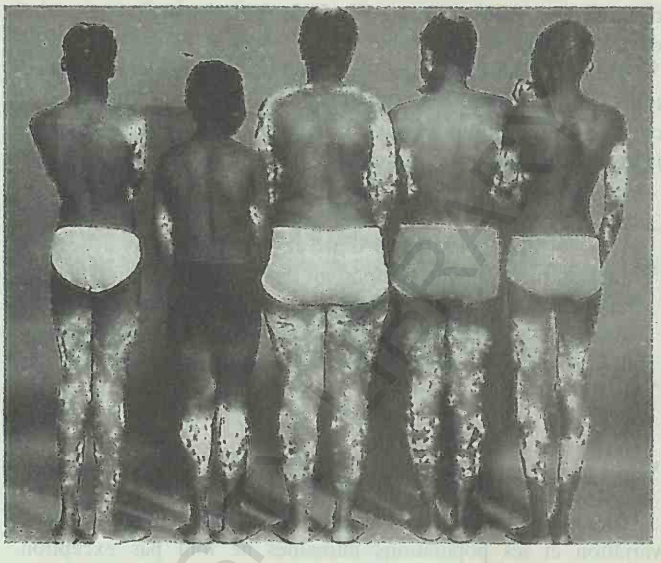
Cas simples de génétique mendélienne en agriculture

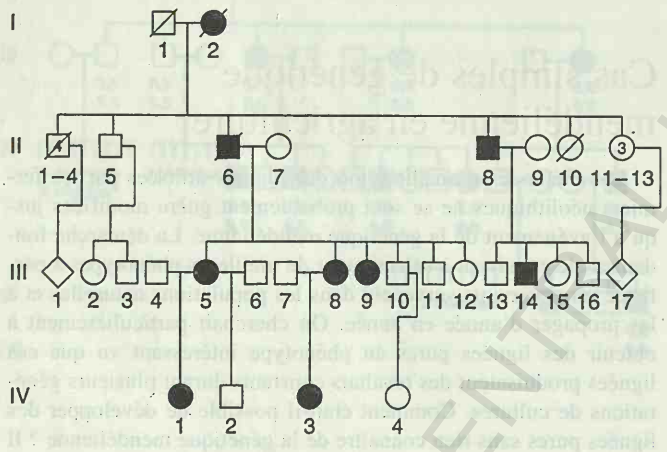
Les méthodes d'amélioration des plantes utilisées par les fermiers néolithiques ne se sont probablement guère modifiées jusqu'à l'avénement de la génétique mendélienne. La démarche fondamentale consistait à sélectionner de meilleurs phénotypes à partir de rares variants survenant dans les populations naturelles et à les propager d'année en année. On cherchait particulièrement à obtenir des lignées pures au phénotype intéressant vu que ces lignées produisaient des résultats constants durant plusieurs générations de cultures. Comment était-il possible de développer des lignées pures sans rien connaître de la génétique mendélienne ? Il se fait que les plantes autopollinisées (autogames) comme le sont beaucoup de plantes cultivées, tendent par leur nature même à devenir homozygotes car l'autopollinisation réduit l'hétérozygotie de la population comme on peut le voir en examinant les génotypes des parents et l'éventail des génotypes représentés dans leur descendance :

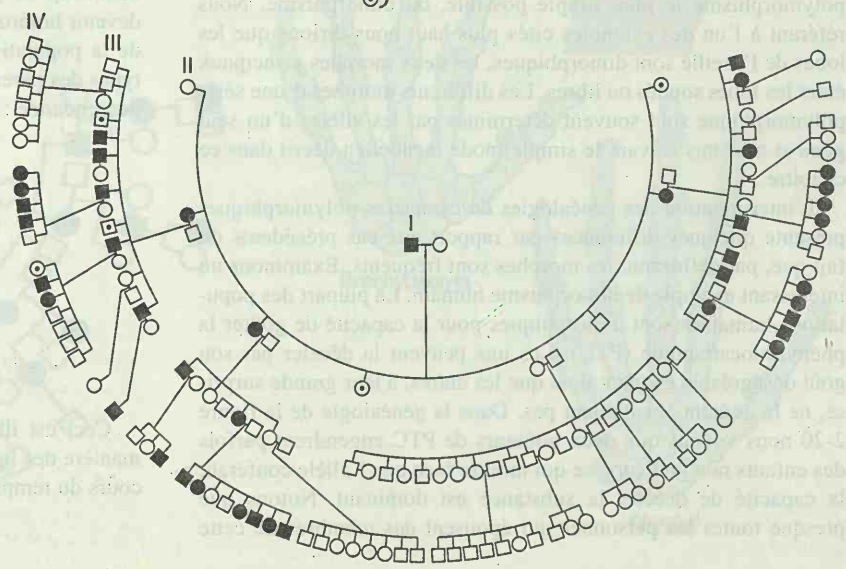


Ceci est illustré plus en détail dans la figure 2-21. De cette manière des lignées pures se sont constituées automatiquement au cours du temps.









BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY

Figure 2-19. La bigarrure de la peau, un phénotype humain dominant et rare. Bien qu'il se rencontre de manière sporadique chez tous les groupes humains, c'est chez les individus à peau sombre qu'il se remarque le plus. (a) Vus de face et de dos des individus affectés IV-1, IV-3, III-5, III-8 et III-9 dans la généalogie montrée en (b). Remarquer la variation dans l'expression du gène au sein de la même famille. Une généalogie plus vaste d'origine norvégienne, est représentée en (c). On pense que ces modes de pigmentation sont dus à une interférence de l'allèle dominant avec la migration des mélanocytes (cellules productrices de mélanine) de la surface dorsale à la surface ventrale au cours du développement. La tache frontale blanche est particulièrement caractéristique et s'accompagne souvent d'une mèche de cheveux blancs. La même condition se recontre chez la souris; dans ce cas également les mélanocytes sont absents du sommet de la tête et du ventre (d). La bigarrure n'est pas une forme d'albinisme ; les cellules des taches claires gardent leur potentiel génétique de production de mélanine mais puisqu'elles ne sont pas des mélanocytes elles ne sont pas programmées à en faire. Dans le véritable albinisme les cellules n'ont plus le potentiel de synthétiser de la mélanine. (L'ADN de l'allèle bigarré a récemment été reconnu comme une forme de *c-kit*, un type de gène appelé proto-oncogène, dont nous parlerons au chapitre 7). (a, b de I. Winship, K. Young, R. Martell, R. Ramesar, D. Curtis et P. Beighton, «Piebaldism : an autonomous autosomal dominant entity», *Clinical Genetics* 39, 1991, 330; c de C. Stern, *Principles of Human Genetics*, 3ème éd., copyright © 1973 par W.H. Freeman et cie ; d fourni par R.A. Fleischman, Université du Texas, Southwestern Medical Center, Dallas- voir aussi R.A. Fleischman, D.L. Saltman, V. Stastny et S. Zneimer, «Deletion of the *c-kit* protooncogene in

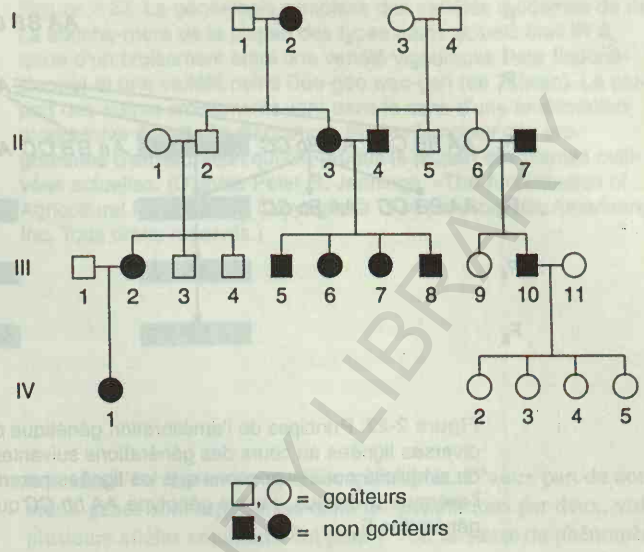


Figure 2-20. Une généalogie de l'aptitude à goûter la PTC.

Génération	AA	Aa	aa
0	0	100	0
1	25	50	25
2	37,5	25	37,5
3	43,75	12,5	43,75
4	46,875	6,25	46,875
∞	50	0	50

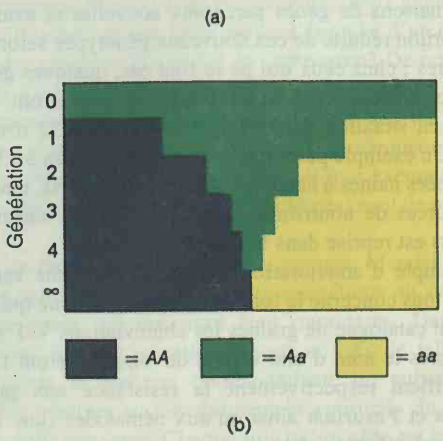


Figure 2-21. L'autofécondation (et de manière générale les croisements consanguins, ou «inbreeding») produit une proportion d'homozygotes récessifs qui croît au fil des générations. (a) Les proportions relatives de trois génotypes à travers plusieurs générations en posant que tous les individus de la génération *O* sont *Aa* et que tous se reproduisent à la même vitesse. A chaque génération, *AA* et *aa* se reproduisent identiques à eux-mêmes mais les individus *Aa* produisent des descendants *Aa*, *AA* et *aa* dans le rapport 2 : 1 : 1. (b) Une illustration graphique de la façon dont évoluent les proportions relatives des génotypes respectifs.

BCU UNIVERSITY LIBRARY

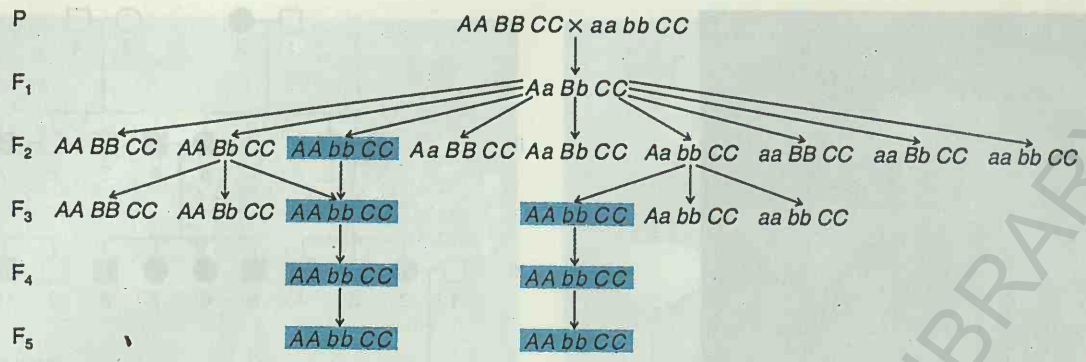


Figure 2-22. Principes de l'amélioration génétique des plantes. On produit un hybride puis on sélectionne diverses lignées au cours des générations suivantes afin d'obtenir des lignées pures améliorées. Par souci de simplicité nous supposons que les lignées parentales ne diffèrent que par deux gènes (*A* et *B*). Dans l'exemple ci-dessus, c'est le génotype *AA bb CC* qui sera retenu après examen des phénotypes de la génération F_2.

Ces pratiques d'amélioration peu élaborées pâtissaient cependant d'un défaut majeur : le cultivateur se voyait forcé de s'en remettre aux combinaisons génétiques favorables apparaissant dans la nature. Avec l'avènement de la génétique mendélienne, il devint possible de combiner par hybridation et réassortiments ultérieurs des qualités appartenant à différentes lignées pures. Cette démarche est la base même de l'amélioration génétique moderne.

Les principes du traitement génétique à mettre en œuvre chez les plantes pour produire de meilleurs génotypes sont les suivants. Quand il s'agit de plantes qui s'autopollinisent naturellement, telles que le riz ou le froment, on hybride deux lignées pures (chacune porteuse d'un génotype favorable) par pollinisation croisée manuelle ; on obtient ainsi une F_1. On laisse alors la F_1 s'autoféconder et ses paires d'allèles hétérozygotes se réassortir pour produire de nombreux génotypes différents dont certains présenteront des combinaisons de gènes parentaux nouvelles et avantageuses. Une proportion réduite de ces nouveaux génotypes seront déjà des lignées pures ; chez ceux qui ne le sont pas, quelques générations successives obtenues par autofécondation amèneront les gènes concernés en situation homozygote. La figure 2-22 résume cette méthode. Un exemple particulièrement important en est la production de lignées naines à haute productivité chez le riz, une des principales sources de nourriture dans le monde. La succession des croisements est reprise dans la figure 2-23.

Un exemple d'amélioration génétique chez une espèce bien connue de tous concerne la tomate. A toute personne qui a consulté un récent catalogue de graines les abbréviations V, F et N mentionnées après le nom d'une variété de tomates seront familières. Elles signifient respectivement la résistance aux pathogènes *Verticillium* et *Fusarium* ainsi qu'aux nématodes (une résistance naturellement présente chez les types sauvages et introduite par croisement chez les variétés domestiques). Un phénotype utile chez la tomate est le mode de croissance dit «déterminé». Chez la plupart des espèces de tomates les extrémités des tiges peuvent continuer à croître (croissance dite indéterminée) mais chez les lignées déterminées, la plupart des tiges se terminent par une inflorescence. Des deux les plantes déterminées sont les plus touffues et les plus compactes ; il faut également moins les tuteurer (figure 2-24). La croissance de type déterminé est due à un allèle récessif sp («self-pruning», littéralement auto-émondant) que l'on a transmis par croisement à de nombreuses variétés. Le symbole *sp* désigne un seul gène ; la plupart des symboles génétiques sont composés de plus d'une lettre. Un autre allèle utile (d'un autre gène) est *u* (pour maturation uniforme ou groupée) ; cet allèle élimine la zone ou renflement vert présent à la base de la queue sur le fruit même. Les généticiens de la tomate ont produit une grande diversité de types morphologiques dont beaucoup ont fait leur chemin jusque dans les supermarchés et les boutiques de jardinage (figure 2-25).

A citer de tels exemples nous pourrions remplir des pages ! Le point important c'est que la génétique mendélienne simple, telle que nous l'avons décrite dans ce chapitre, est le fondement rationnel et méthodologique des techniques modernes utilisées pour la propagation contrôlée des plantes cultivées. Des génotypes complexes peuvent être construits à partir d'une série de lignées ancestrales, chacune apportant un caractère désirable. Lorsque nous évoquons l'ingénierie génétique nous pensons aux techniques génétiques des années 1970 et 1980 mais en fait l'ingénierie génétique appliquée à l'amélioration des plantes a déjà une histoire.

La génétique mendélienne a également fourni les principes théoriques de l'amélioration génétique des animaux, permettant d'atteindre une efficacité supérieure à celle des pratiques traditionnelles. Des techniques plus récentes, telles que l'emploi de semence congelée, la superovulation, l'insémination artificielle, la congélation des embryons et le recours à des mères porteuses chez certaines espèces de bétail, ont permis aux éleveurs d'amplifier le nombre de descendants caractérisés par un génotype particulier — un nombre normalement limité par la durée de vie de l'animal.

Les variants et leur importance pour la dissection génétique

Nous avons vu que l'analyse génétique se fonde sur les différences existant entre parents. Sans variant aucune analyse génétique n'est possible. Quelle est la provenance de cette matière première de l'analyse génétique ? Nous ne pourrons répondre intégralement à cette question que dans les chapitres suivants. En bref, la

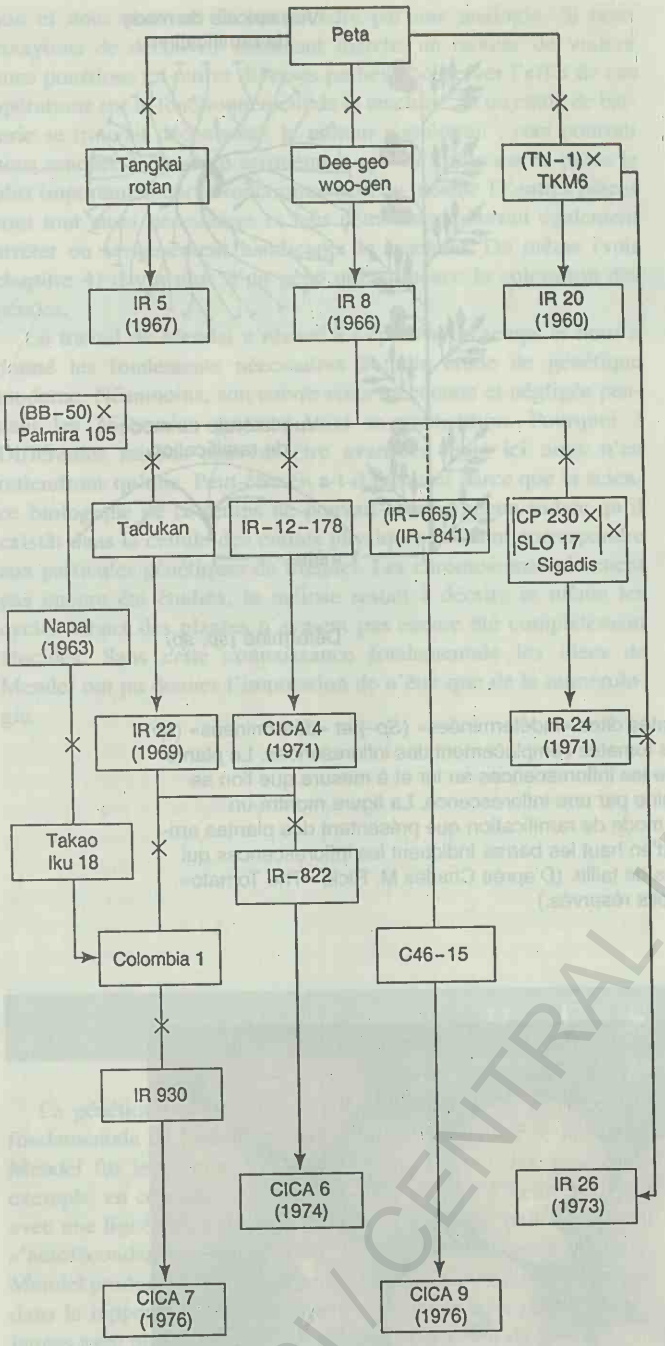


Figure 2-23. La généalogie complexe des variétés modernes de riz. La souche-mère de la plupart des types nains actuels était IR 8, issue d'un croisement entre une variété vigoureuse Peta (indonésienne) et une variété naine Dee-geo woo-gen (de Taïwan). La plupart des autres croisements vont dans le sens d'une amélioration progressive d'IR 8. Ce diagramme illustre l'ampleur des programmes d'amélioration qui ont produit la plupart des plantes cultivées actuelles. (D'après Peter R. Jennings, «The Amplification of Agricultural Production». Copyright © 1976 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

plupart des variants utilisés par Mendel (ainsi que par les améliorateurs de jadis et d'aujourd'hui) surviennent spontanément dans la nature ou dans les populations produites par les sélectionneurs, sans intervention délibérée de leur part.

Rappelons que les variants peuvent être rares ou communs. Certains variants rares sont anormaux. Sans aucun doute beaucoup d'entre eux seraient éliminés par la sélection naturelle en l'absence d'une intervention délibérée mais on peut les maintenir en culture afin d'en étudier les gènes responsables. D'autre part de nombreux gènes sont représentés dans les populations par deux, voire plusieurs allèles communs. On peut y voir la cause du phénomène de polymorphisme génétique, c'est-à-dire la coexistence de plusieurs variants phénotypiques relativement fréquents et génétiquement déterminés. Les causes de ce polymorphisme ne sont généralement pas faciles à élucider mais ils apportent aux généticiens un abondant matériel d'étude.

Nous avons vu que l'analyse génétique des formes variantes peut identifier un gène qui joue un rôle important dans un processus biologique. Cet aspect central de la génétique moderne est appelé **dissection génétique**. Mendel fut le premier «chirurgien génétique». Par l'analyse génétique, il put identifier et distinguer les uns des autres les diverses composantes du processus héréditaire d'une manière aussi convaincante que s'il en avait effectué la microdissection. Que les gènes étudiés concernassent la forme ou la couleur du petit pois ou encore d'autres caractères était sans grande importance. Ces gènes servaient simplement de **marqueurs génétiques**, qui permirent à Mendel de discerner les processus héréditaires de ségrégation et d'assortiment. Un marqueur génétique est un allèle utilisé pour «estampiller» une structure ou un processus biologique tout au long d'une expérience. C'est presque comme si Mendel avait pu «peindre» deux allèles de deux couleurs différentes et leur faire passer l'épreuve d'un croisement afin de voir comment ils allaient se comporter ! De nos jours les marqueurs sont utilisés couramment en génétique et partout en biologie pour étudier toutes sortes de processus que les marqueurs eux-mêmes n'affectent pas directement. Les marqueurs sont souvent morphologiques, comme chez le pois, par exemple, mais les variants moléculaires (d'ADN et de protéines) sont de plus en plus utilisés.

Sans s'en être probablement rendu compte, Mendel avait aussi inventé un autre aspect de la dissection génétique où, cette fois, la *nature* des gènes mis en cause était importante. Dans ce type d'analyse les variants génétiques sont utilisés de telle manière qu'en étudiant la fonction correspondante on puisse tirer des conclusions relatives au fonctionnement «normal» du gène et au processus qu'il gouverne. Chaque fois qu'un gène est identifié par analyse mendélienne, c'est une composante d'un processus biologique qui est révélée.

Dès qu'un gène a été reconnu comme affectant, par exemple, la couleur des pétales chez les pois, nous le qualifions de gène majeur mais que signifie au juste celà ? Il est majeur en ce qu'il exerce un effet marquant sur la couleur des pétales. Mais pouvons-nous en conclure qu'il contrôle *la seule* étape réellement importante dans le processus de coloration des pétales ? La réponse est

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

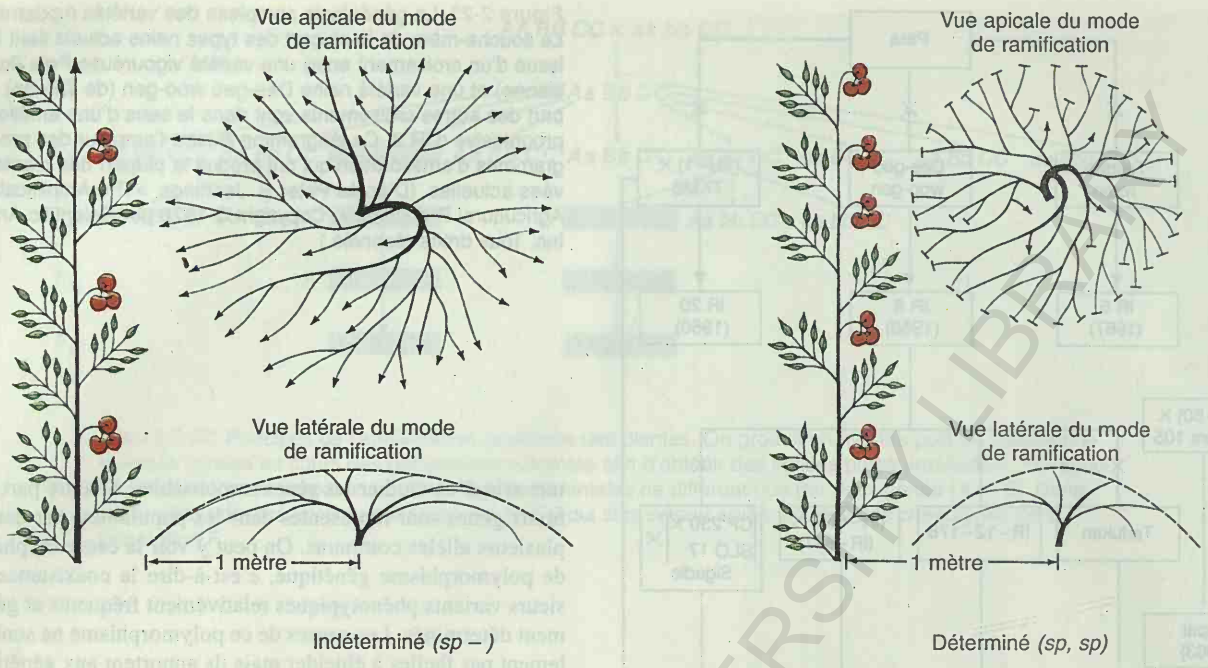


Figure 2-24. Caractéristiques de la croissance de tomates dites «indéterminées» (*Sp–*) et «déterminées» (*sp sp*) les flèches indiquent le sens de la croissance et les tomates l'emplacement des inflorescences. La plante «déterminée» porte de moins en moins de feuilles entre les inflorescences au fur et à mesure que l'on se rapproche du sommet de la tige et chaque tige se termine par une inflorescence. La figure montre un exemple de rameau pour chaque type de plantes et le mode de ramification que présentent des plantes arrivées à maturité (vu d'en haut et de côté) (dans la vue d'en haut les barres indiquent les inflorescences qui terminent la croissance des tiges). Notez les différences de taille. (D'après Charles M. Rick, «The Tomato». Copyright © 1978 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

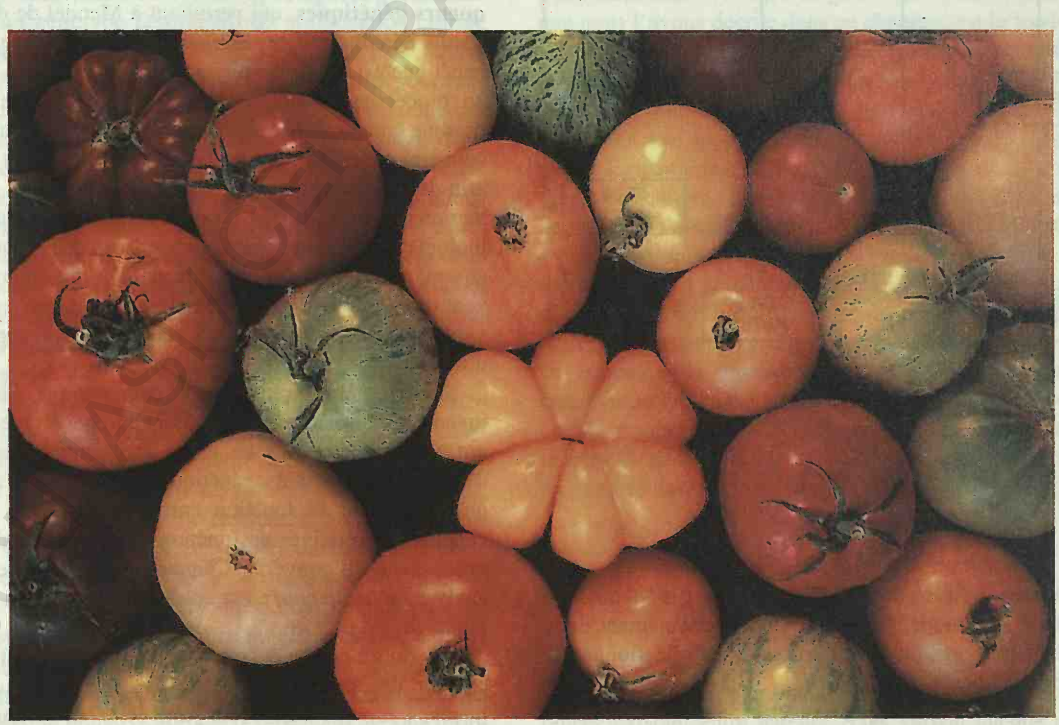


Figure 2-25. Quelques-uns des nombreux phénotypes de tomates produits par les pépiniéristes. (Ray Clark)

non et nous pouvons le comprendre par une analogie. Si nous essayions de découvrir comment marche un moteur de voiture nous pourrions en retirer diverses parties et observer l'effet de ces opérations sur le fonctionnement de la machine. Si un câble de batterie se trouvait déconnecté, le moteur s'arrêterait ; ceci pourrait nous amener à conclure erronément que ce cable est *la* pièce la plus importante pour le fonctionnement du moteur. D'autres pièces sont tout aussi nécessaires et leur démontage pourrait également arrêter ou sérieusement handicaper la machine. De même (voir chapitre 4) il y a plus d'un gène qui influence la coloration des pétales.

Le travail de Mendel a résisté à l'épreuve du temps et nous a donné les fondements nécessaires à toute étude de génétique moderne. Néanmoins, son œuvre resta méconnue et négligée pendant les 35 années qui ont suivi sa publication. Pourquoi ? Différentes raisons peuvent être avancées mais ici nous n'en retiendrons qu'une. Peut-être en a-t-il été ainsi parce que la science biologique de ce temps ne pouvait fournir aucun indice qu'il existât dans la cellule des entités physiques pouvant correspondre aux particules génétiques de Mendel. Les chromosomes n'avaient pas encore été étudiés, la méiose restait à décrire et même les cycles vitaux des plantes n'avaient pas encore été complètement élucidés. Sans cette connaissance fondamentale les idées de Mendel ont pu donner l'impression de n'être que de la numérologie.

Message L'œuvre de Mendel est le prototype de l'analyse génétique. Vue sous cet angle elle est significative pour les raisons suivantes.

1. Elle a montré comment on pouvait étudier des processus biologiques, en utilisant des marqueurs génétiques.
2. Elle a montré comment on peut élucider les fonctions des gènes eux-mêmes par l'étude d'allèles variants.
3. Elle a connu des prolongements d'une grande portée en agriculture et en médecine.

Au-dessus du porche du musée Mendel à Brno on trouve une inscription en tchèque dont le texte est à la fois résigné et prophétique: «MA DOBA PRIJDE» ou «Mon temps viendra». Le temps de Mendel est arrivé, en effet: le vingtième siècle a vu s'épanouir une formidable floraison de travaux sur l'hérédité, qui tous trouvent leur origine dans les féconds préliminaires établis dans ce modeste jardin de monastère. Ses hypothétiques «facteurs» (ou gènes comme nous les appelons désormais) ont acquis une réalité déjà bien comprise sur le plan moléculaire; ce sont même des génomes entiers que l'on déchiffre aujourd'hui. Les plus spectaculaires de nos travaux les plus récents sur le clonage, la thérapie génétique, les animaux et plantes transgéniques, le projet de séquence du génome humain et bien d'autres questions, tous se rattachent à ce seul article intitulé «Expériences sur l'hybridation des plantes», présenté en 1865 à la Societé d'Histoire Naturelle de Brünn.

RÉSUMÉ

La génétique moderne repose sur le concept de gène, l'unité fondamentale de l'hérédité. Par ses expériences sur le petit pois Mendel fut le premier à reconnaître l'existence des gènes. Par exemple, en croisant une lignée pure de plantes à fleurs pourpres avec une lignée pure de plantes à fleurs blanches, puis en laissant s'autoféconder la génération F_1, qui était entièrement pourpre, Mendel produisit une génération F_2 de plantes pourpres et blanches dans le rapport 3 : 1. Par des croisements du type plantes à pois jaunes avec plantes à pois verts, il découvrit qu'un rapport 1 : 2 : 1 était sous-jacent à tous les rapports 3 : 1. De ces rapports mathématiques précis Mendel déduisit qu'il existe des déterminants héréditaires d'une nature particulaire (appelés aujourd'hui gènes). Chez les plantes supérieures et les animaux les gènes existent par paires. Les différentes formes d'un gène sont appelées allèles. Les allèles peuvent être dominants ou récessifs.

Dans un croisement entre plantes hétérozygotes à pois jaunes (*Jj*) et homozygotes à pois verts (*jj*) on obtient des individus à pois jaunes et à pois verts dans le rapport 1 : 1. Au moyen de ces données Mendel confirma sa première loi selon laquelle la disjonction méiotique conduit à la formation en proportions égales de deux types de gamètes, *J* et *j*. Chaque gamète n'emporte donc qu'un gène de chaque paire. L'union des gamètes en un zygote se fait au hasard, quel que soit l'allèle que le gamète apporte.

Les conclusions précédentes furent déduites des résultats obtenus par Mendel dans le cas de croisements monohybrides. Dans les croisements dihybrides Mendel trouva des rapports 9 : 3 : 3 : 1 entre les membres de la F_2, ce qui représente en fait une combinaison aléatoire de deux rapports 3 : 1. De ces rapports Mendel déduisit que les deux paires de gènes étudiées dans un croisement dihybride se comportaient indépendamment l'une de l'autre. Ce concept est énoncé comme la deuxième loi de Mendel.

Bien qu'il ne soit pas possible de contrôler les unions humaines, la génétique mendélienne est de grande conséquence pour l'homme. De nombreuses maladies et d'autres conditions exceptionnelles chez l'homme sont déterminées par des allèles récessifs transmis suivant un mode mendélien ; d'autres anomalies rares sont dues à des allèles dominants. En outre, la génétique mendélienne est largement appliquée dans l'agriculture moderne. En combinant par hybridation et réassortiment les qualités favorables présentes chez diverses lignées, les généticiens peuvent en produire de nouvelles, présentant des phénotypes supérieurs, tant chez les animaux que chez les plantes.

Finalement Mendel est l'inventeur des techniques de base de la dissection génétique encore utilisées aujourd'hui. L'une de ces techniques consiste à utiliser les gènes comme marqueurs pour suivre à la trace les processus héréditaires de ségrégation et d'assortiment. Une autre est l'étude de variants génétiques pour découvrir le fonctionnement normal des gènes.

Diagramme conceptuel

Tracer un schéma conceptuel reliant le plus grand nombre possible des termes suivants. Noter que ces termes sont mentionnés dans un ordre quelconque.

assortiment indépendant/génotype/phénotype/dihybride/croisement test/rapport 9 : 3 : 3 : 1/autofécondation/gamètes/fécondation/rapport 1 : 1 : 1 : 1.

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Chaque chapitre comporte un problème (avec sa solution) qui met en jeu des concepts discutés dans des chapitres différents. Dans toute discipline l'apprentissage est un processus linéaire qui procède d'un sujet à un autre dans un ordre approprié. Naturellement, la discipline elle-même n'est pas linéaire mais plutôt un ensemble intégré que le professionnel embrasse dans son entièreté. Nous espérons qu'en mettant l'accent sur cet aspect synthétique nous arriverons à une vue plus claire de la génétique dans son ensemble et que le lecteur sera ainsi amené à ne pas considérer le contenu de chaque chapitre isolément. Lorsque nous passons d'un chapitre au suivant, les nouvelles connaissances s'ajoutent à celles préalablement acquises et la matière se dépose en couches successives comme dans un bulbe d'oignon.

Deux lignées pures de lapin, que nous appellerons A et B ont été croisées entre elles. Un mâle de la lignée A a été accouplé à une femelle de la lignée B puis les lapins de la F_1 ont été croisés entre eux pour produire une F_2. L'analyse a montré que les 3/4 des animaux de la F_2 avait une graisse subcutanée blanche et le 1/4 restant une graisse jaune. Lorsque la F_1 fut aussi analysée on y trouva de la graisse blanche. Plusieurs années après on répéta l'expérience en reprenant le même mâle de la lignée A et la même femelle de la lignée B. Cette fois, non seulement la F_1 mais aussi toute la F_2 (22 animaux) avait de la graisse blanche. La seule différence paraissant pertinente entre l'expérience originale et sa répétition était que lors de la première les lapins avaient été nourris de végétaux frais et la fois suivante d'un mélange commercial. Essayez d'expliquer la différence entre les deux types de résultats et montrez comment votre explication peut être mise à l'épreuve.

Solution

Sur la base des résultats de la première expérience, les éleveurs auraient été fondés à proposer que la couleur de la graisse est déterminée par une paire d'allèles : blanche ou jaune. En effet, les résultats rappellent manifestement ceux que Mendel obtint avec les pois. Blanc devrait être dominant de sorte que nous pourrions représenter l'allèle blanc par B et l'allèle jaune par b. On pourrait alors schématiser les données comme suit :

P	$BB \times bb$
F_1	Bb
F_2	$\frac{1}{4}\ BB$
	$\frac{1}{2}\ Bb$
	$\frac{1}{4}\ bb$

Nul doute que si les parents avaient été sacrifiés on aurait déduit que l'un (sans pouvoir dire lequel) devait avoir possédé de la graisse blanche et l'autre de la graisse jaune. Heureusement il n'en fut rien et ce sont les mêmes animaux qui furent accouplés à nouveau, produisant un résultat différent et fort intéressant. En science il arrive souvent qu'une observation inattendue mène à la découverte d'un principe nouveau ; plutôt que de s'intéresser à autre chose, il se révèle souvent utile de tenter d'expliquer la contradiction apparente. Donc, dans ce cas pourquoi n'observons-nous plus le rapport 3 : 1 ? Considérons quelques explications possibles.

Tout d'abord il se pourrait que le génotype des parents ait changé. Qu'un changement spontané affecte ainsi l'animal entier où au moins ses gonades, est très peu probable ; le sens commun lui-même nous enseigne que les organismes tendent à rester stables. Cette idée ne peut cependant être écartée.

En deuxième lieu, il se pourrait que l'échantillon des 22 lapins de la F_2 n'en contienne aucun à graisse jaune du fait du seul hasard. Ceci aussi ne paraît guère vraisemblable, vu la taille respectable de l'échantillon mais reste néanmoins possible.

Une troisième explication s'inspire du principe discuté au chapitre 1 et d'après lequel les gènes n'agissent pas dans le vide ; leur effet dépend de l'environnement. D'où l'aphorisme bien utile : «le génotype plus l'environnement égale le phénotype». Il s'ensuit naturellement que les mêmes gènes puissent agir différemment dans des environnements différents, de telle sorte que :

génotype 1 plus environnement 1 égale phénotype 1

et

génotype 1 plus environnement 2 égale phénotype 2

Dans le problème qui nous occupe les différents régimes nutri-

BCU LAUSANNE / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

tionnels constituent des environnements différents ; des lors il serait possible d'expliquer les résultats en supposant que l'allèle récessif *b* ne produise de la graisse jaune que lorsque l'animal se nourrit de végétaux frais. Cette idée peut être mise à l'épreuve. On pourrait par exemple répéter encore l'expérience en utilisant un régime alimentaire frais mais les parents pourraient déjà ne plus être en vie. Un test plus convainquant consisterait à croiser entre eux plusieurs des lapins à graisse blanche qui forment la F_2 de la deuxième expérience. Si l'interprétation originale était correcte, les 3/4 environ devraient porter au moins un allèle récessif *b* correspondant à de la graisse jaune et, si leur descendance était nourrie de végétaux frais, le caractère jaune devrait apparaître dans des proportions mendéliennes. Par exemple on pourrait choisir deux lapins qui se trouveraient être respectivement des types *Bb* et *bb*; dans ce cas la descendance devrait être moitié blanche, moitié jaune.

S'il n'en était pas ainsi, c'est-à-dire si aucun jaune n'apparaissait dans la descendance de couples d'individus F_2, on serait bien obligé de se rabattre sur la première ou la deuxième explication. La deuxième peut être testée en examinant un nombre d'animaux plus élevé ; si les résultats ne la confirment pas, il nous reste la première, difficile à tester directement.

Comme vous l'avez probablement deviné, c'est bien le régime alimentaire qui était en cause et d'une manière qui illustre admirablement l'influence que peut exercer l'environnement. Les légumes frais contiennent des pigments jaunes - les xanthophylles - et l'allèle dominant *B* confère aux lapins la capacité de dégrader ces substances en dérivés incolores (c'est-à-dire «blancs»). Cependant, les animaux *bb* n'ont pas cette capacité et les xanthophylles s'accumulent telles quelles dans la graisse, lui donnant une coloration jaune. Lorsque leur nourriture ne contient pas de xanthophylles, les animaux *B* - aussi bien que les *bb* ne forment que de la graisse blanche.

PROBLÈMES RÉSOLUS

Dans chaque chapitre cette section présente quelques problèmes résolus, qui illustrent la méthode à appliquer pour aborder ceux qui suivent. Le but de ces séries de problèmes est de mettre à l'épreuve votre compréhension des principes généraux exposés dans le chapitre que vous venez de lire. La meilleure manière de prouver sa maîtrise d'un sujet est d'appliquer cette connaissance dans une situation réelle ou simulée. N'oubliez cependant pas qu'il n'existe aucune procédure purement automatique pour résoudre ces problèmes. Les trois principales ressources à votre disposition sont les principes génétiques fraîchement appris, le bon sens et le tâtonnement !

Quelques conseils généraux avant de commencer. En premier lieu il est absolument essentiel de lire et de comprendre la question dans son ensemble. Voyez quels faits sont décrits, quelles suppositions doivent être faites, quels indices sont fournis dans l'énoncé de la question et quelles déductions peuvent être tirées de l'information disponible. En second lieu, soyez méthodiques. Regarder la question fixement n'aide guère. Enoncez à nouveau l'information contenue dans la question à votre propre manière, de préférence en utilisant un diagramme ou un schéma de travail pour vous aider à réfléchir. Bonne chance.

1. Considérez trois pois jaunes et ronds, désignés A, B et C. Chacun a fourni une plante qui a été croisée avec une autre issue d'un pois vert et ridé. Cent pois issus de chaque croisement ont été analysés ; ils se sont répartis en classes phénotypiques comme indiqué ci-dessous :

A :	51 jaunes et ronds
	49 verts et ronds
B :	100 jaunes et ronds
C :	24 jaunes et ronds
	26 jaunes et ridés
	25 verts et ronds
	25 verts et ridés

Quels étaient les génotypes de A, B et C ? (Utilisez des symboles génétiques de votre choix ; soyez sûrs de bien définir chacun d'entre-eux).

Solution

Notez que chacun des pois est impliqué dans un croisement du type

jaune et rond × vert et ridé
↓
descendance

Comme A, B et C ont tous trois été croisés avec la même plante, toute différence entre les trois populations de descendants doit provenir de différences entre les génotypes des pois A, B et C ;

Ceci vous rappelle sans doute bien des choses apprises en lisant ce chapitre mais voyons à présent ce que nous pouvons déduire de ces données-ci. Quels sont les caractères dominants ? C'est le croisement B qui nous donne la clef. Dans ce cas, en effet, le mode de transmission est

jaune et rond × vert et ridé
↓
tous jaunes et ronds

Donc les phénotypes jaunes et ronds sont dominants puisque la dominance est définie par le phénotype de l'hybride. Maintenant nous savons que le parent vert et ridé impliqué dans chaque croisement doit être complètement récessif, une situation très commode parce qu'elle signifie que chaque croisement est un croisement test, le type généralement le plus instructif.

BCUIASI

Considérons maintenant la descendance de A caractérisée par un rapport 1 : 1 de jaunes et de verts. Ceci constitue une démonstration de la première loi de Mendel (ségrégation égale) et montre qu'en ce qui concerne le caractère couleur, le croisement a du être du type hétérozygote × homozygote récessif. Posant J = jaune et j = vert nous avons

$$Jj \times jj$$
$$\downarrow$$
1/2 *Jj* (jaunes)
1/2 *jj* (verts)

Quant au caractère forme, puisque toute la descendance est à pois ronds, le croisement doit avoir associé un homozygote dominant à un homozygote récessif. Si R = rond et r = ridé, nous avons

$$RR \times rr$$
$$\downarrow$$
Rr (ronds)

Combinant les deux caractères, nous avons

$$Jj\ RR \times jj\ rr$$
$$\downarrow$$
1/2 *Jj Rr*
1/2 *jj Rr*

Dès lors il devient évident que le croisement B doit avoir été

$$JJ\ RR \times jj\ rr$$
$$\downarrow$$
Jj Rr

puisque toute hétérozygotie dans un pois B devrait avoir produit plusieurs phénotypes descendants, et non un seul.

Qu'en est-il de C ? Ici nous sommes confrontés à un rapport de 50 jaunes à 50 verts (1 : 1) et un rapport de 49 ronds à 51 ridés (aussi 1 : 1). Donc les deux paires de gènes du pois C doivent avoir été hétérozygotes ; dès lors le croisement C était

$$Jj\ Rr \times jj\ rr$$
$$\downarrow$$

$\frac{1}{2}$ *Jj* → $\frac{1}{2}$ *Rr* ⟶ $\frac{1}{4}$ *Jj Rr*
$\frac{1}{2}$ *Jj* → $\frac{1}{2}$ *rr* ⟶ $\frac{1}{4}$ *Jj rr*
$\frac{1}{2}$ *jj* → $\frac{1}{2}$ *Rr* ⟶ $\frac{1}{4}$ *jj Rr*
$\frac{1}{2}$ *jj* → $\frac{1}{2}$ *rr* ⟶ $\frac{1}{4}$ *jj rr*

Ce cas constitue une bonne démonstration de la deuxième loi de Mendel (comportement indépendant de paires de gènes différentes).

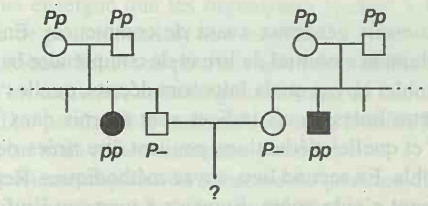
Comment un généticien aurait-il analysé ces croisements ? Essentiellement comme nous mais plus directement : «jaune et rond dominant ; ségrégation d'un seul gène en A ; B homozygote dominant ; ségrégation indépendante de deux gènes en C».

2. La phénylcétonurie (PCU) est une maladie humaine héréditaire qui empêche le corps de métaboliser la phénylalanine, un constituant des protéines que nous consommons. La PCU se manifeste dès la petite enfance et, si elle n'est pas traitée, provoque généralement un retard mental. La PCU est déterminée par un simple allèle mendélien récessif.

Un couple veut avoir des enfants mais consulte un conseiller génétique parce que l'homme a une sœur affectée de PCU et la femme un frère dans le même état. Aucune des deux familles n'a connu d'autre cas semblable. Ils demandent au conseiller de déterminer la probabilité que leur premier enfant soit affecté de PCU. Quelle est cette probabilité ?

Solution

Que pouvons-nous déduire des données ? Si nous désignons l'allèle responsable de la PCU par p et son correspondant normal par P, le frère de la femme et la sœur de l'homme doivent être tous deux *pp*. Pour donner le jour à ces individus atteints, les quatre grands-parents doivent avoir été des hétérozygotes normaux. Nous pouvons dès lors établir la généalogie comme suit :



Ces conclusions tirées, le problème devient une simple application de la règle du produit. Un homme et une femme ne peuvent avoir un enfant atteint de PCU que s'ils sont tous deux hétérozygotes (il va de soi qu'eux-mêmes ne peuvent être malades). Les unions grand-parentales sont toutes deux de simples croisements mendéliens monohybrides et devront dès lors donner naissance à des descendants dans les proportions suivantes:

$\frac{1}{4}$ *PP*
$\frac{1}{2}$ *Pp*
} $\frac{3}{4}$ Normaux

$\frac{1}{4}$ *pp* $\frac{1}{4}$ PCU

Nous savons que l'homme et la femme sont normaux ; dès lors la probabilité d'être hétérozygote est pour chacun de 2/3, parce que dans la classe *P*–, 2/3 sont *Pp* et 1/3 *PP*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La probabilité que l'homme et la femme soient *tous deux* hétérozygotes est 2/3 × 2/3 = 4/9. Si tous deux sont hétérozygotes, un quart de leurs enfants doivent être affectés de PCU ; de sorte que la probabilité que leur premier enfant le soit est 1/4 ; par conséquent la probabilité qu'ils soient hétérozygotes *et* que leur enfant ait la PCU (c'est-à-dire la réponse à notre problème) est 4/9 × 1/4 = 4/36 = 1/9

PROBLÈMES

En général les problèmes les plus simples sont les premiers de la série. Les plus difficiles sont marqués d'un astérisque.

1. Quelles sont les lois de Mendel ?

2. Que feriez-vous pour déterminer si une drosophile (mouche du vinaigre) de phénotype *A* est de génotype *AA* ou *Aa* ?

3. Au cours de plusieurs années un couple de cobayes noirs a produit 29 descendants noirs et 9 blancs. Quels sont les génotypes des parents et ceux de leurs descendants ?

4. Considérer la grille de Punnett représentée sur la figure 2-10.
a. Combien de génotypes y-a-t'il dans les 16 cases?
b. Quel est le rapport génotypique sous-jacent au rapport phénotypique 9:3:3:1.
c. Pouvez-vous trouver une formule simple pour calculer le nombre de génotypes dans les descendances respectives de croisements dihybrides, trihybrides etc...? Répétez l'opération pour les phénotypes.
d. Mendel prédisait que toutes les classes phénotypiques représentées dans les cases de la grille de Punnett sauf une devait enfermer plus d'un génotype. En particulier il opéra plusieurs croisements pour identifier les génotypes sous-jacents au phénotype rond et jaune. Trouvez deux manières d'identifier les différents génotypes de cette classe phénotypique (souvenez-vous que tous les pois jaunes et ronds sont d'aspect identique).

5. Vous recevez trois dés : un rouge (R), un vert (V) et un bleu (B). Calculez la probabilité des résultats suivants si vous lancez les trois dés en même temps :

a. 6(R) 6(V) 6(B)

b. 6(R) 5(V) 6(B)

c. 6(R) 5(G) 4(B)

d. aucun six

e. deux six et un cinq quelle que soit la couleur

f. trois six ou trois cinq

g. le même nombre sur les trois dés

h. un nombre différent sur chaque dé

6. **a.** Vous recevez trois pots contenant des billes, réparties comme suit :

pot 1	600 rouges	et	400 blanches
pot 2	900 bleues	et	100 blanches
pot 3	10 vertes	et	990 blanches

Si vous retirez à l'aveuglette une bille de chaque pot quelle est la probabilité d'obtenir

(1) une rouge, une bleue et une verte
(2) trois blanches
(3) une rouge, une verte et une blanche
(4) une rouge et deux blanches
(5) une colorée et deux blanches
(6) au moins une blanche

***b.** Chez une certaine plante, R = rouge et r = blanc. Vous laissez s'autoféconder un hétérozygote rouge Rr dans le but d'obtenir une plante blanche. Quel est le nombre minimal de graines à semer pour avoir au moins 95 % de chances d'obtenir une plante blanche ? (UN CONSEIL : songer à votre réponse à la question 6a (6)).

***c.** Lorsqu'une femme se voit injecter un oeuf fécondé in vitro, la probabilité qu'il s'implante correctement est de 20%. Si l'on injecte simultanément 5 oeufs à une femme, quelle est la probabilité que celle-ci devienne enceinte?

7. **a.** La capacité de goûter la substance phénylthiocarbamide est un phénotype autosomique dominant et l'incapacité correspondante est récessive. Si une femme goûteuse issue d'un père non goûteur épouse un homme goûteur qui, lors d'un mariage précédent a eu une fille non goûteuse, quelle est la probabilité que leur premier enfant soit

(1) une fille non goûteuse
(2) une fille goûteuse
(3) un garçon goûteur

b. Quelle est la probabilité que leurs *deux* premiers enfants soit goûteurs de l'un ou l'autre sexe?

8. John et Martha envisagent d'avoir des enfants mais le frère de John souffre de galactosémie (une maladie autosomique récessive) et l'arrière grand-mère de Martha en était affectée aussi.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Martha a une soeur qui a trois enfants dont aucun n'est galactosémique. Quelle est la probabilité que le premier enfant de John et Martha soit galactosémique.

Décomposons le problème

Dans certains chapitres nous développons un problème en présentant une liste d'exercices qui aident à mettre en oeuvre les principes et connaissances concernant le domaine où le problème est posé. Vous pouvez procéder vous-mêmes à des exercices semblables pour d'autres problèmes.

Avant de vous attaquer au problème 8, arrêtez-vous aux questions suivantes que nous présentons ici comme exemples.

a. Peut-on reformuler le problème sous forme d'une généalogie? Si oui, établissez-en une.

b. Certaines parties du problème peuvent-elles êtres reformulées sous forme de grilles de Punnett?

c. Certaines parties du problème peuvent-elles être reformulées sous forme de diagramme dichotomique?

d. Dans la généalogie identifiez une union suivie de descendance qui illustre la première loi de Mendel.

e. Définisser tous les termes scientifiques du problème et assurez-vous que vous comprenez tous les termes utilisés.

f. Quelles suppositions devez-vous faire pour répondre au problème?

g. Quels membres de la famille non encore mentionnés faut-il prendre en considération et pourquoi?

h. Quelles règles de statistique seraient ici d'application et à quelles situations peut'on les appliquer? Le problème comporte-t'il de telles situations?

i. Citez deux propriétés générales des affections autosomiques récessives dans les populations humaines.

j. En quoi la rareté du phénotype étudié est-elle importante à considérer dans l'analyse généalogique en général et que peut-on en dire dans le cas de ce problème-ci?

k. Dans cette famille quels sont les génotypes qui sont certains et ceux qui le sont pas?

l. En quoi la partie de cette généalogie propre à John diffère-t'elle de celle de Martha? Comment ceci affecte-t'il vos calculs?

m. Y a-t'il de l'information sans importance dans la manière dont le problème est formulé?

n. En quoi la solution de ce problème est-elle semblable ou différente des solutions que vous avez déjà trouvées?

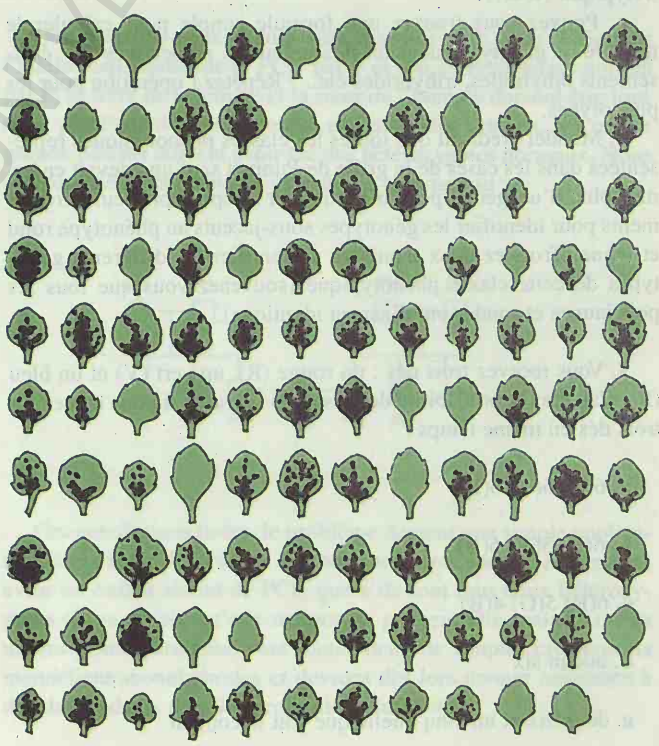
o. Pouvez-vous résumer le dilemme humain que pose ce problème?

A présent essayer de résoudre le problème. Si vous n'y arrivez pas tachez d'identifier les obstacles et de formuler votre difficulté par écrit. Retournez alors à cette liste et voyez si l'un de ces points concerne cette difficulté.

9. Les bovins de la race d'Holstein sont noir et blanc. Charles, un superbe taureau noir et blanc, a été acquis par un fermier pour 600.000 francs. La progéniture engendrée par Charles était d'aspect normal. Cependant l'accouplement de certains de ses descendants produisit des animaux rouges et blancs avec une fréquence d'environ 25 pour cent. Charles fut bientôt rayé du registre des progéniteurs de la race d'Holstein. Donnez-en la raison, en utilisant les symboles appropriés.

10. Supposez que mari et femme soient tous deux hétérozygotes pour un allèle récessif de l'albinisme. S'ils engendrent des jumeaux bivitellins (issus de deux oeufs fécondés), quelle est la probabilité que ceux-ci présentent tous deux le même phénotype de pigmentation?

11. La plante appelée «nombril de Vénus» ou «petite bourrache» *(Omphalodes verna)* croît sur l'île de Vancouver et dans les zones basses de la Colombie Britannique continentale. Ses populations sont dimorphiques pour la présence de taches pourpres sur les feuilles : certaines plantes en ont, d'autres non. Un exemplaire trouvé dans la nature près de Nanaimo possède des feuilles tachetées : on l'a transféré au laboratoire avant la floraison et laissé s'autoféconder. Les graines ont été recueillies et semées puis sur chacune des plantes ainsi obtenues on a prélevé au hasard une feuille ; leur aspect, caractéristique de toutes les autres feuilles portées par la même plante, est représenté sur la figure (voir colonne de gauche) :

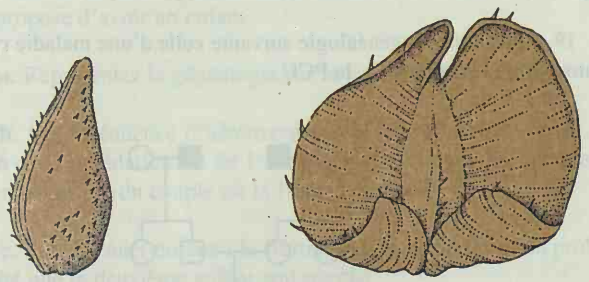


a. Formulez une hypothèse génétique pour expliquer ces résultats. Définissez tous les symboles utilisés et les différentes classes génotypiques, y compris celui de la plante originale.

b. Comment mettriez-vous votre hypothèse à l'épreuve ? Soyez explicite et précis.

12. Peut-on prouver qu'un animal *n'est pas* porteur d'un allèle récessif (c'est-à-dire qu'il n'est pas hétérozygote pour un gène donné) ? Justifiez votre réponse.

13. Dans la nature la plante *Plectritis congesta* est dimorphique pour la forme du fruit; certains individus ne portent que des fruits ailés, d'autres que des fruits sans ailes (voir le dessin ci-dessous).



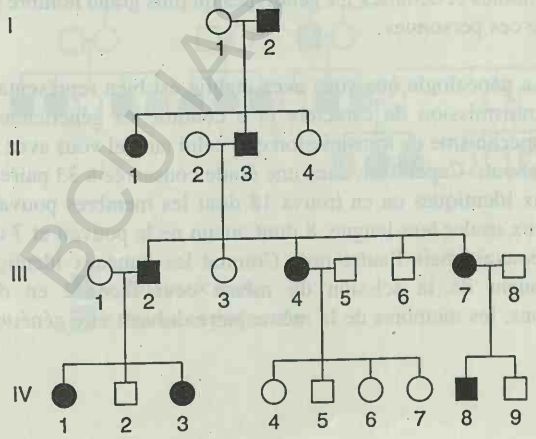
Fruit non ailé — Fruit ailé

On croise entre eux (ou on laisse s'autoféconder) quelques plantes recueillies dans la nature avant leur floraison. Les résultats obtenus sont les suivants :

	Nombre de descendants	
Pollinisation	Ailés	Sans ailes
Ailé (autofécondé)	91	1*
Ailé (autofécondé)	90	30
Sans ailes (autofécondé)	4*	80
Ailé × sans ailes	161	0
Ailé × sans ailes	29	31
Ailé × sans ailes	46	0
Ailé × ailé	44	0
Ailé × ailé	24	0

Interprétez ces résultats et déduisez-en le mode de transmission de ces phénotypes affectant la forme du fruit. Utilisez des symboles. (NOTE : les phénotypes des descendants marqués d'un astérisque requièrent probablement une explication non génétique. Qu'en pensez-vous ?)

14. La généalogie suivante est celle d'une affection héréditaire de la peau, relativement bénigue et rare.

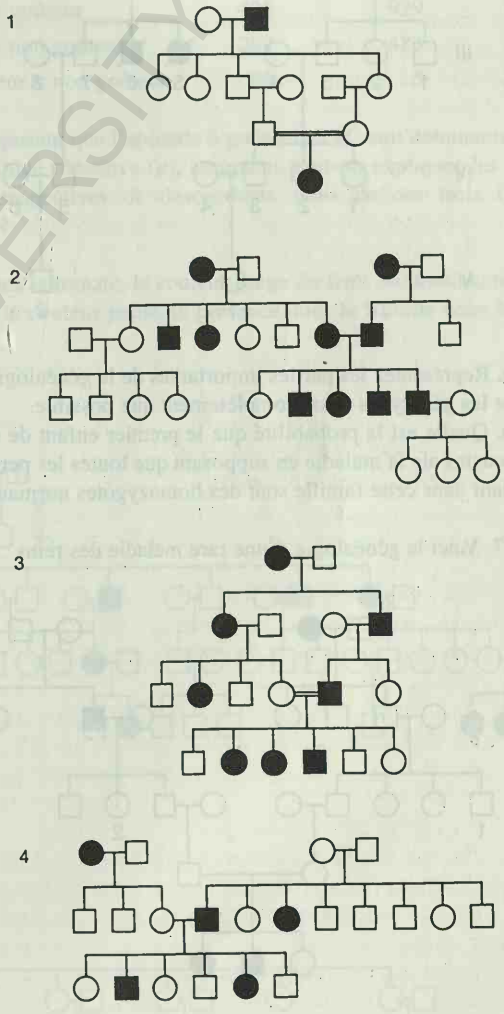


a. Cette affection est-elle héritée comme phénotype récessif ou dominant? Justifiez votre réponse.

b. Donnez les génotypes du plus grand nombre possible d'individus de cette généalogie (choisissez vous même un symbole allélique).

c. Considérez les quatre enfants non affectés des parents III-4 et III-5. Parmi toutes les descendances de quatre enfants issues de parents ayant de tels génotypes, quelle est la proportion que vous vous attendez à trouver totalement indemne?

15. La figure ci-dessous montre quatre généalogies humaines. Les symboles noirs représentent une condition anormale (phénotype) transmise de façon mendélienne.



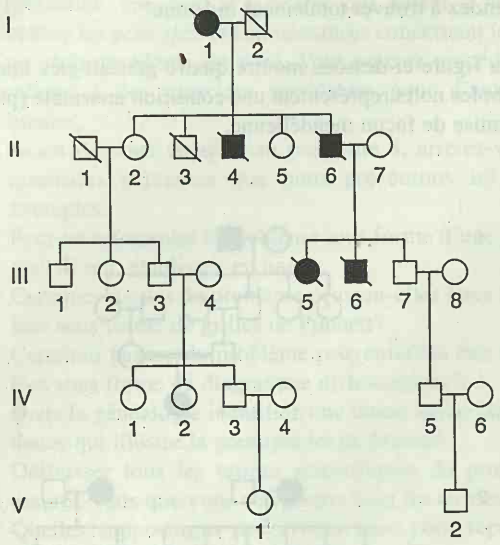
a. Pour chaque généalogie déterminez si le phénotype anormal est dominant ou récessif. Donnez le raisonnement suivi.

b. Dans chaque généalogie identifiez le plus grand nombre de génotypes possible.

16. La maladie de Tay-Sachs (ou «idiotie infantile amaurotique» est une affection humaine rare due à l'accumulation de substances toxiques dans les cellules nerveuses. L'allèle récessif res-

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

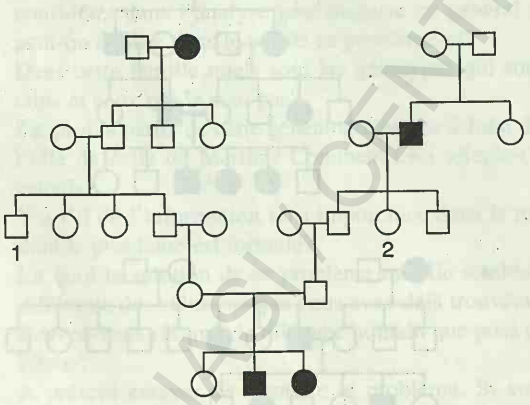
ponsable de cette maladie est transmis de manière mendélienne simple. Pour des raisons inconnues, l'allèle est plus fréquent dans les populations de juifs ashkénazes de l'Europe de l'est. Une femme désire épouser son cousin du premier degré mais le couple découvre que la soeur de leur grand-père commun est morte de la maladie de Tay-Sachs durant sa petite enfance.



a. Représentez les parties importantes de la généalogie et identifiez les génotypes aussi complètement que possible.

b. Quelle est la probabilité que le premier enfant de ce couple de cousins aie la maladie en supposant que toutes les personnes se mariant dans cette famille sont des homozygotes normaux?

17. Voici la généalogie d'une rare maladie des reins :



a. Retracez par le raisonnement la transmission de cette maladie.

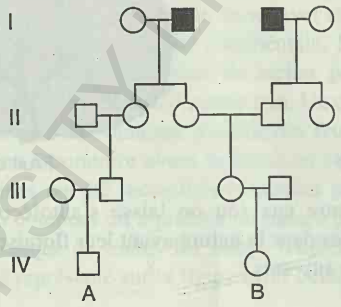
b. Si les individus 1 et 2 se marient, quelle est la probabilité que leur premier enfant soit atteint de cette maladie ?

18. La généalogie ci-dessous concerne la maladie de Huntington, un dysfonctionnement tardif du système nerveux. Les traits indiquent les décès.

a. Cette généalogie est-elle compatible avec le mode de transmission héréditaire de la maladie d'Huntington mentionné dans ce chapitre?

b. Considérez deux nouveaux-nés dans les deux branches de la généalogie, Suzanne à gauche et Alain à droite. Etudiez le diagramme de la figure 2-17 et dites ce que vous pensez de la probabilité qu'ils développeront la maladie. Supposez pour la discussion que les parents ont des enfants de 25 ans.

19. Considérez la généalogie suivante celle d'une maladie rare, autosomique et récessive, la PCU.



a. Dressez la liste du plus grand nombre possible de génotypes.

b. Si les individus A et B se marient quelle est la probabilité que leur premier enfant ait la PCV?

c. Si leur premier enfant est normal, quelle est la probabilité que le second ait la PCV?

d. Si leur premier enfant a la maladie, quelle est la probabilité que le second soit indemne?

(Supposez que toutes les personnes contractant une union avec des membres de cette généalogie ne portent pas l'allèle anormal).

20. a. On trouve dans les populations humaines un curieux polymorphisme : certaines personnes peuvent recourber vers le haut les bords de leur langue (nous dirons rouler leur langue) alors que d'autres en sont incapables. Voici un exemple de ce dimorphisme, dont la cause est toujours mystérieuse. Au sein de la même famille, un garçon ne pouvait rouler sa langue alors qu'à son grand dépit, sa soeur le pouvait. En outre, ses parents, ses deux grands-pères, un de ses oncles paternels et une de ses tantes paternelles le pouvait ; par contre une de ses tantes paternelles, un de ses oncles paternels et un de ses oncles maternels ne le pouvaient pas. Etablissez la généalogie de cette famille en définissant bien vos symboles et déduisez les génotypes du plus grand nombre possible de ces personnes.

b. La généalogie que vous avez établie est bien représentative de la transmission du caractère et a conduit les généticiens au même mécanisme de transmission que celui auquel vous avez surement abouti. Cependant, dans une étude consacrée à 33 paires de jumeaux identiques on en trouva 18 dont les membres pouvaient tous deux rouler leur langue, 8 dont aucun ne le pouvait et 7 dont un le pouvait mais l'autre non. Comme les jumeaux identiques proviennent de la scission du même oeuf fécondé en deux embryons, les membres de la même paire doivent être génétique-

BU MASS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ment identiques. Dès lors comment pouvez-vous concilier l'existence de ces sept paires divergentes avec votre explication génétique de la généalogie ?

21. Un allèle récessif peu fréquent et transmis de manière mendélienne provoque la maladie appelée fibrose cystique. Un homme au phénotype normal dont le père avait la fibrose cystique épouse une femme au phénotype normal étrangère à la famille et le couple se propose d'avoir un enfant.

a. Représentez la généalogie sur la base de ces données.

b. Si la fréquence d'hétérozygotes pour la fibrose cystique au sein de la population est de 1 sur 50, quel est la probabilité que le premier enfant du couple ait la fibrose cystique ?

c. Si le premier enfant a la fibrose cystique, quelle est la probabilité que le deuxième enfant soit normal ?

22. Chez l'homme, la couleur noire ou brune des cheveux et des poils est due à des quantités et des combinaisons variables de substances appelées mélanines. Par contre, la couleur rousse est due à un type de substance différent sur lequel on sait peu de choses. Le roux est un trait familial et le schéma ci-dessus représente une nombreuse généalogie établie pour ce caractère.

a. Le mode de transmission apparaissant dans cette généalogie suggère-t-il que la couleur rousse soit due à un allèle dominant ou récessif d'un gène transmis sur le mode mendélien ?

b. Pensez- vous que l'allèle roux est fréquent dans la population?

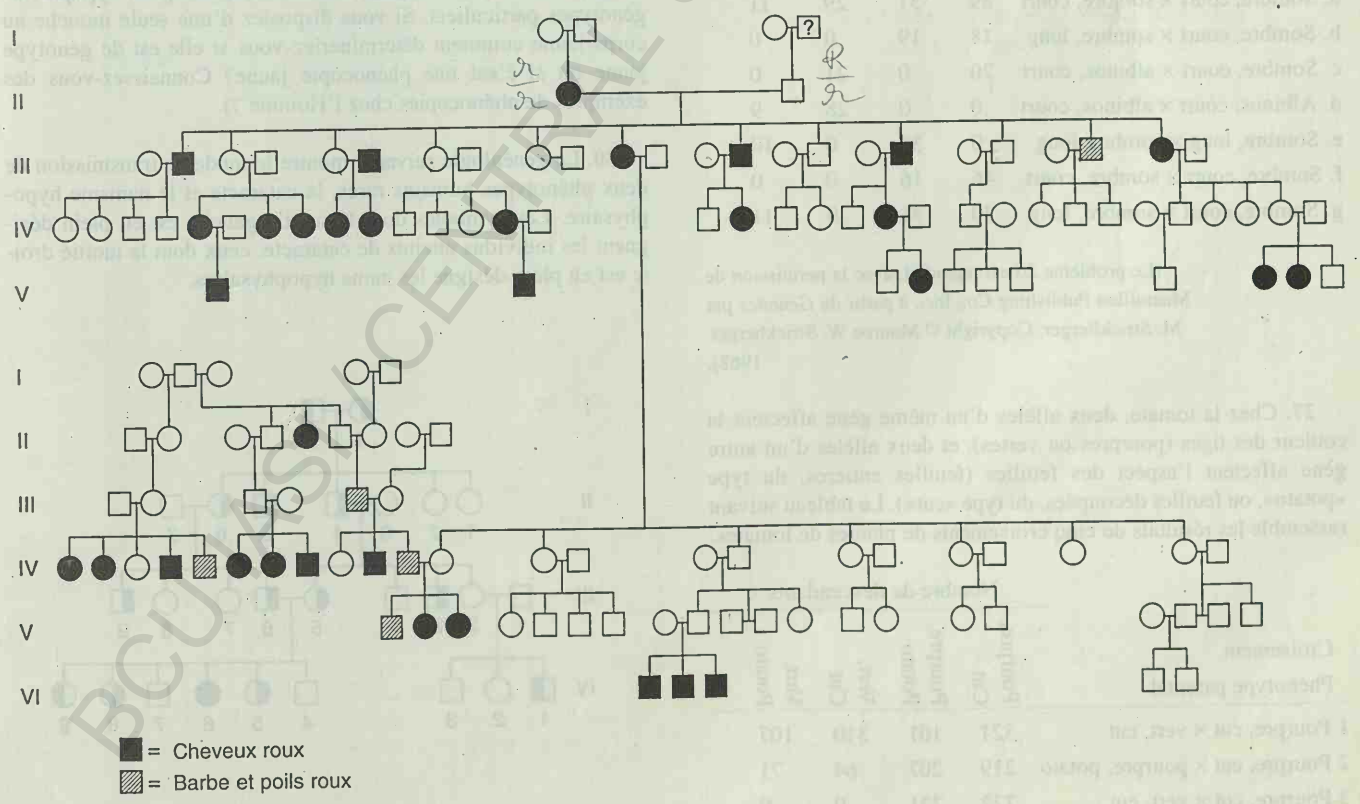
(Généalogie tirée de W.R. Singleton et B. Ellis, *Journal of Heredity*, 55, 261, 1964).

23. Plusieurs familles furent examinées pour leur aptitude à goûter la phénylthiocarbamide (PTC), les unions regroupées en trois classes et les descendants de chaque type dénombrés. Les résultats sont donnés ci-dessous :

		Enfants	
Parents	Nombre de familles	Goûteurs	Non goûteurs
Goûteur × goûteur	425	929	130
Goûteur × non goûteur	289	483	278
Non goûteur × non goûteur	86	5	218

En supposant que l'aptitude à goûter la PTC soit dominante (*P*) et l'inaptitude récessive (*p*), comment peut-on expliquer les proportions respectives de descendants issus de ces trois types d'unions ?

24. Chez la tomate, la couleur rouge du fruit est dominante par rapport à la couleur jaune, la présence dans le fruit de deux loges



BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

est dominante par rapport à la présence de nombreuses loges, et la stature élevée est dominante par rapport au nanisme. Un cultivateur dispose de deux lignées pures, l'une rouge, à deux loges et naine, et l'autre jaune, à loges nombreuses et de grande taille. A partir de ces plantes il désire produire une nouvelle lignée pure qui soit jaune, à deux loges et grande. Comment doit-il procéder ? Indiquez non seulement les croisements à faire mais aussi combien de descendants il faut examiner dans chaque cas.

25. Chez l'homme, le nanisme achondroplastique et la neurofibromatose sont deux affections dominantes extrêmement rares. Si une femme atteinte d'achondroplasie épouse un homme neurofibromatique, quels sont les phénotypes que pourraient présenter leurs enfants et dans quelles proportions (définissez clairement les symboles que vous utilisez) ?

26. Chez le chien, la teinte de robe sombre est dominante par rapport à la teinte albinos et les poils courts le sont par rapport aux poils longs. En supposant que ces effets soient dus à deux gènes qui s'assortissent indépendamment, déterminez quels sont les génotypes des parents dans chacun des croisements repris ci-dessous où utilisez les symboles *S* et *s* pour la couleur de la robe (*S* = sombre) et les symboles *C* et *c* pour la longueur des poils (*C*= court). Supposez que les génotypes sont homozygotes sauf quand il y a lieu d'en douter.

	Nombre de descendants			
Phénotype parental	Sombre, court	Sombre, long	Albinos, court	Albinos, long
a. Sombre, court × sombre, court	89	31	29	11
b. Sombre, court × sombre, long	18	19	0	0
c. Sombre, court × albinos, court	20	0	21	0
d. Albinos, court × albinos, court	0	0	28	9
e. Sombre, long × sombre, long	0	32	0	10
f. Sombre, court × sombre, court	46	16	0	0
g. Sombre, court × sombre, long	30	31	9	11

(Le problème 26 est reproduit, avec la permission de Macmillan Publishing Co., Inc., à partir de *Genetics* par M. Stricklierger. Copyright © Monroe W. Strickberger, 1968).

27. Chez la tomate, deux allèles d'un même gène affectent la couleur des tiges (pourpres ou vertes), et deux allèles d'un autre gène affectent l'aspect des feuilles (feuilles entières, du type «potato», ou feuilles découpées, du type «cut»). Le tableau suivant rassemble les résultats de cinq croisements de plantes de tomates.

	Nombre de descendants			
Croisement Phénotype parental	Pourpre, Cut	Pourpre, Potato	Vert, Cut	Vert, Potato
1 Pourpre, cut × vert, cut	321	101	310	107
2 Pourpre, cut × pourpre, potato	219	207	64	71
3 Pourpre, cut × vert, cut	722	231	0	0
4 Pourpre, cut × vert, potato	404	0	387	0
5 Pourpre, potato × vert, cut	70	91	86	77

a. Quels allèles sont-ils dominants ?

b. Quels sont les génotypes les plus probables pour les parents de chaque croisement ?

(Le problème 27 est tiré de A.M. Srb, R.D. Owen, et R.S. Edgar, *General Genetics*, 2d ed. Copyright © 1965 par W.H. Freeman and Company).

28. Nous avons surtout envisagé des croisements impliquant deux gènes seulement mais les mêmes principes restent d'application pour des nombres plus élevés. Considérons le croisement

Aa Bb Cc Dd Ee × aa Bb cc Dd ee

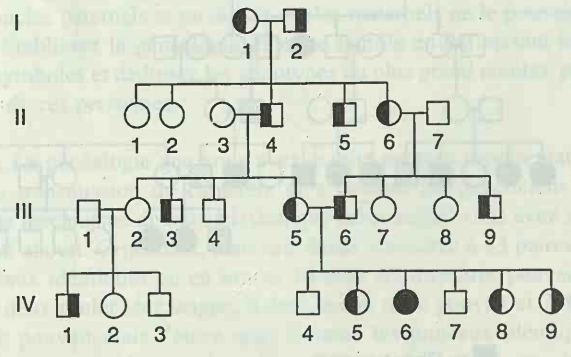
a. Quelle proportion de la descendance sera-t-elle *phénotypiquement* semblable (1) au premier parent, (2) au second, (3) à l'un ou l'autre, et (4) à aucun d'entre eux ?

b. Quelle proportion de la descendance sera-t-elle *génotypiquement* semblable (1) au premier parent, (2) au second, (3) à l'un ou l'autre, et (4) à aucun d'entre eux ?

Supposez que l'assortiment indépendant soit de règle.

29. Pour la plupart les membres de l'espèce *Drosophila melanogaster* ont des corps de couleur brune mais les individus homozygotes pour l'allèle récessif *y* sont jaunes. Cependant, si des larves de lignées pures *YY* reçoivent une nourriture contenant des sels d'argent, elles se développent en adultes de couleur jaune. On les appelle des **phénocopies**, soit des «copies» phénotypiques de génotypes particuliers. Si vous disposiez d'une seule mouche au corps jaune comment détermineriez-vous si elle est de génotype jaune ou si c'est une phénocopie jaune? Connaissez-vous des exemples de phénocopies chez l'Homme ?).

30. La généalogie suivante montre le mode de transmission de deux phénotypes humains rares, la cataracte et le nanisme hypophysaire. Les symboles dont la moitié gauche est en plein désignent les individus atteints de cataracte, ceux dont la moitié droite est en plein désigne les nains hypophysaires.



a. Quel est le mode de transmission le plus probable pour chacun de ces phénotypes? Expliquez.

b. Donnez le plus grand nombre possibles de génotypes de la génération III.

c. Si une union se produisait entre les individus IV-1 et IV-5, quelle est la probabilité que leur premier enfant soit nain et atteint de cataracte? Qu'il soit normal phénotypiquement? (d'après J. Kuspira et R. Bhambhani, *Compendium of Problems in Genetics.* Copyright c 1994 by Wm. C. Brown).

31. Un généticien du maïs possède trois lignées pures de génotypes *aaBBCC, AAbbCC,* et *AABBcc.* Les phénotypes déterminés par a, b et c accroissent la valeur marchande du maïs de telle sorte qu'il désire les combiner en une lignée pure aabbcc.

a. Concevez un plan de croisements pour obtenir cette lignée.

b. A chaque étape, précisez quels phénotypes vous sélectionnerez et donnez en les fréquences prévues.

c. Existe-t'il plus d'une façon d'arriver au résultat? Quelle est la meilleure? (supposez que les trois paires de gènes se réassortissent indépendamment.

NB.: le maïs se prête aux croisements et à l'auto fécondation).

32. a. Une population de plantes annuelles comportait exlusivement des individus de génotype *aa.* Une année, une inondation introduisit plusieurs graines de génotype *AA* et *Aa* dans la population. Immédiatement après l'introduction on dénombrait 55% de *AA*, 40% de *Aa* et 5% de *aa.* Comme la région ne contenait pas d'insectes capables de cross-polliniser ces plantes, toutes celles-ci s'autofécondaient. Après trois générations d'autofécondation, quelles étaient les proportions de génotypes *AA, Aa* et *aa*?

b. Imaginez une plante dont 40% des paires de gènes sont hétérozygotes (*Aa, Bb, Cc* etc...). Après trois générations d'autofécondation quelle proportion de ces paires de gènes seront-elles encore hétérozygotes?

c. En quoi la réponse au point b concerne-t'elle la réponse au point a?

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

3

La théorie chromosomique de l'hérédité

Garniture chromosomique ($2n$ =14) du blé sauvage *Aegilops umbellulata*. (Deux paires d'homologues alignées sont montrées dans la partie supérieure droite de l'image). Les chromosomes sont en métaphase mitotique, de sorte qu'ils contiennent chacun deux chromatides soeurs. La préparation a été traitée avec un colorant fluorescent qui se fixe à l'ADN et lui donne un teinte bleuâtre. Deux sondes fluorescentes qui révèlent spécifiquement les régions codant pour les ARN ribosomiques (ARNr) ont aussi été utilisées. La sonde rouge indique la position des gènes des ARNr 18S et 25S, la sonde verte montre celle des gènes de l' ARNr 5S. Ces régions d'ADNr sont présentes en deux exemplaires dans le génome, à deux loci situés sur des chromosomes différents, et en ordre inverse. (Photo fournie par Alexandra Castilho et J.S. Heslop-Harrison.)

CONCEPTS-CLÉS

- Les gènes sont des segments de chromosomes.
- La mitose est la division nucléaire qui produit deux noyaux identiques contenant chacun le même matériel génétique que le noyau de départ.
- La méiose est la division nucléaire au cours de laquelle une cellule germinale contenant deux jeux complets de chromosomes est divisée en quatre produits méiotiques (gamètes) dont chacun ne contient plus qu'un jeu de chromosomes.
- Les lois de Mendel de ségrégation égale des allèles et d'assortiment indépendant se fondent sur la disjonction des homologues de chaque paire de chromosomes et sur le comportement indépendant de chaque paire vis-à-vis des autres lors de la méiose.
- La transmission des gènes portés par les chromosomes sexuels se caractérise par des rapports phénotypiques particuliers liés au sexe.

PURDUE UNIVERSITY LIBRARY

La beauté de l'analyse de Mendel tient à ce qu'il n'est pas nécessaire de savoir ce que sont les gènes ni comment ils déterminent le phénotype pour analyser les produits d'un croisement ou pour en prédire les résultats en appliquant les lois de ségrégation des allèles et d'assortiment indépendant. Il suffit de représenter de façon abstraite des facteurs hypothétiques impliqués dans l'hérédité (disons les gènes) par des symboles, sans se préoccuper de leur nature précise ou de leur localisation cellulaire. Toutefois, bien que la validité des principes mendéliens ait été vérifiée lors de l'analyse de maints génotypes chez différents organismes, la question se pose à présent de savoir à quelle structure (ou structures) cellulaire correspondent ces gènes hypothétiques.

Un progrès majeur dans le développement de la génétique fut d'associer les gènes, tels que définis par Mendel, à des structures cellulaires bien spécifiques : les chromosomes. Ce concept simple est connu sous le nom de **théorie chromosomique de l'hérédité.** Bien que simple, cette idée a eu des implications méthodologiques profondes en unissant étroitement la génétique et la cytologie, ce qui a permis d'établir une corrélation entre les résultats d'expériences de croisements et le comportement de structures observables au microscope. Cette conjonction est toujours un élément essentiel de l'analyse génétique contemporaine et trouve nombre d'applications dans les domaines de la médecine, de l'agriculture et de l'étude de l'évolution.

Mitose et méiose

Comment la théorie chromosomique a-t-elle pris corps? Des indices d'origine variée se sont accumulés progressivement. Une première série d'indices vint du comportement des chromosomes pendant la division du noyau cellulaire. Voyons quelles furent les observations qui menèrent à la découverte de deux types différents de division nucléaire appelées *mitose* et *méiose*. Dans l'intervalle séparant les recherches de Mendel de leur redécouverte, de nombreux biologistes, bien qu'ignorants des résultats de Mendel, s'intéressèrent à l'hérédité et approchèrent le problème d'une façon tout-à-fait différente. Ces chercheurs s'intéressaient à la localisation cellulaire du matériel héréditaire. Les gamètes étaient une cible d' investigation prioritaire puisqu'ils constituent le seul lien entre les générations. Comme l'oeuf et le spermatozoïde avaient des tailles différentes mais étaient censés contribuer de façon équivalente au patrimoine génétique de la descendance, il paraissait peu vraisemblable que le cytoplasme fût le siège des structures héréditaires. On savait, par contre, que les noyaux étaient de taille approximativement égale chez les deux gamètes et c'est pourquoi ils furent considérés comme de bons candidats pour abriter les structures héréditaires. Que savait-on du contenu du noyau? Il apparut bientôt clairement que les constituants les plus remarquables en étaient les chromosomes qui possédaient des propriétés uniques les distinguant de toutes les autres structures cellulaires. Une propriété qui retint particulièrement l'attention des biologistes fut la constance du nombre de chromosomes dans les cellules d'un organisme donné, chez les individus d'une espèce déterminée, et de génération en génération au sein de cette espèce, le nombre de chromosomes différant toutefois entre espèces. La question se posait alors de savoir comment le nombre de chromosomes est maintenu. La réponse fut fournie par l'observation au microscope du comportement des chromosomes à la mitose et à la méiose ; de ces observations découla la formulation de la théorie chromosomique - que les chromosomes sont les structures servant de support aux gènes.

La **mitose** est la division nucléaire accompagnant la division des cellules somatiques(c'est-à-dire les cellules d'un eucaryote qui ne sont pas destinées à devenir des cellules sexuelles). C'est ce type de division qui produit un grand nombre de cellules au départ d'une seule cellule progénitrice, comme par exemple, la division d'un oeuf humain fécondé qui produira un organisme multicellulaire constitué de milliards de cellules. Chaque mitose individuelle est en général associée à une seule division cellulaire qui produit deux cellules filles génétiquement identiques.

La **méiose** est le nom donné aux divisions nucléaires chez les cellules qui subissent une division d'un type spécial rencontrée uniquement dans le cycle sexuel. Une cellule qui s'engage dans ce type de division est appelée **méiocyte.** Chaque méiocyte subit deux divisions cellulaires accompagnées de deux divisions du noyau. Il s'ensuit que chaque méiocyte produit généralement quatre cellules que nous appellerons les **produits de la méiose.** Chez l'homme, la méiose a lieu dans les gonades et les produits de la méiose sont les gamètes : le sperme (plus précisément, les spermatozoïdes) et les oeufs. Chez les plantes à fleurs, la méiose s'effectue dans les anthères et les ovaires et les produits de la méiose sont les **méiospores** qui, finalement, formeront les gamètes. Les descriptions des différentes étapes de la mitose et de la méiose qui vont suivre sont délibérément maintenues à un niveau aussi général que possible de façon à s'appliquer à la plupart des organismes chez lesquels ces divisions sont observées. Remarquez toutefois que les illustrations photographiques des différents stades présentées dans les figures 3-2 et 3-3 se rapportent à un seul organisme (une plante à fleurs - *Lilium regale*), et qu'une telle série de photos ne peut habituellement montrer de façon satisfaisante tous les détails de la mitose et de la méiose. C'est pourquoi une série de dessins idéalisés des mêmes étapes est mise en regard des photos illustrant les deux phénomènes.

Mitose

Le cycle cellulaire est la série d'événements qui sépare le stade de croissance où se trouve une cellule du stade équivalent atteint par les cellules filles. Il peut être divisé en plusieurs périodes : **M, S, G1** et **G2**.(figure 3-1). La mitose (M) est habituellement la période la plus courte du cycle, occupant de 5 à 10 pour cent de celui-ci. La synthèse d'ADN s'effectue durant la période S. Les périodes G1 et G2 recouvrent les intervalles entre S et M. L'ensemble des périodes G1, S et G2 constitue l'**interphase**, le temps qui sépare les mitoses. (L'interphase fut parfois appelée «période de repos» ; toutefois beaucoup de fonctions cellulaires sont actives pendant l'interphase, dont la moindre n'est pas, rappelons-nous, la synthèse d'ADN.) Les chromosomes sont difficiles à voir durant l'interphase (figure 3-2a) à cause de leur structure très étirée et de leur emmêlement comparable à celui d'un écheveau de laine

Les événements de la mitose peuvent être schématisés comme suit : chaque chromosome du noyau s'est copié lui-même sur toute sa longueur durant la période S. Cette structure double est clivée à la mitose et produit deux chromosomes fils qui migrent vers des noyaux différents. Le bilan est la production de deux noyaux iden-

Figure 3-1. Etapes du cycle cellulaire. M = mitose, S = synthèse d'ADN, G = intervalle.

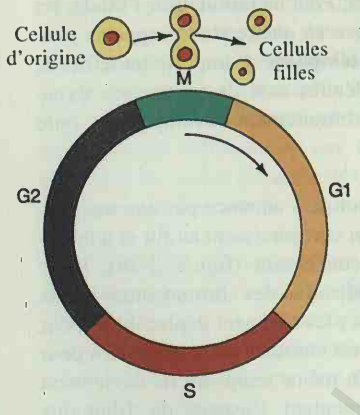
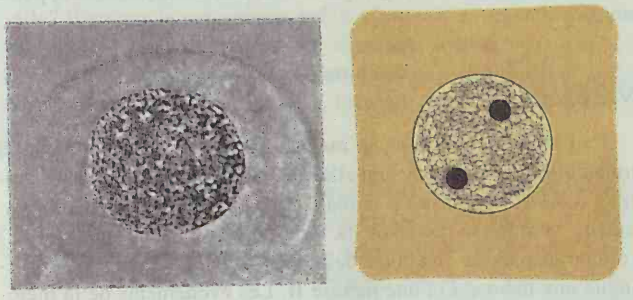


Figure 3-2. Mitose dans les cellules de l'extrémité de la racine chez *Lilium regale*. (a) Interphase. (b) Début de prophase. (c) Fin de prophase. (d) Métaphase. (e) Anaphase. (f) Télophase. (Adapté de J. Mc Leish et B. Snoad, *Looking at Chromosomes*. Copyright 1958, St. Martin's, Macmillan.)

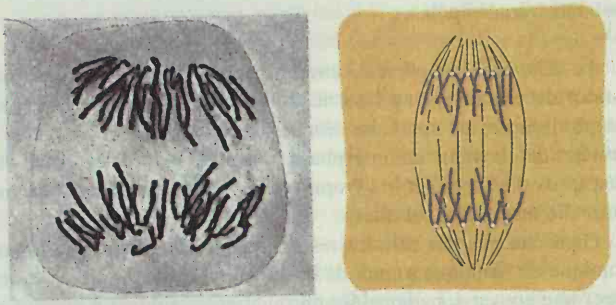


(a) Interphase

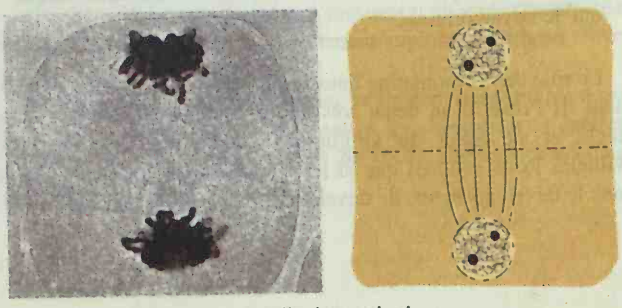
(b) Début de prophase mitotique

(c) Fin de prophase mitotique

(d) Métaphase mitotique



(e) Anaphase mitotique



(f) Télophase mitotique

BASU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

tiques au noyau dont ils sont issus. Pour en rationaliser l'étude, les biologistes ont subdivisé la mitose en quatre stades appelés **prophase, métaphase, anaphase** et **télophase**. Il importe toutefois de souligner que les divisions nucléaires sont des processus dynamiques que nous subdivisons arbitrairement en étapes par pure commodité.

La prophase. Le début de la mitose s'annonce par une meilleure définition des chromosomes qui raccourcissent au fur et à mesure qu'ils se contractent et se condensent (figure 3-2b). Cette condensation provient d'une spiralisation des chromosomes ; cette spiralisation produit des structures plus aisément déplaçables (pour la même raison, la fibre de coton est enroulée sur des bobines pour la manutention et le transport). En même temps qu'ils deviennent visibles, les chromosomes présentent l'aspect de filaments doubles, chacun d'entre eux se composant de deux moitiés longitudinales appelées chromatides (figure 3-2c). Ces chromatides «soeurs» se rejoignent au niveau d'une région appelée centromère. C'est à ce stade que les nucléoles, ces larges structures sphériques intranucléaires, disparaissent. L'enveloppe nucléaire commence à se dégrader et le nucléoplasme et le cytoplasme se confondent.

La métaphase. A ce stade, le **fuseau nucléaire** apparaît clairement. Il s'agit d'une structure ressemblant à une cage à oiseaux qui s'établit dans la région correspondant au noyau ; elle est constituée d'une série de fibres approximativement parallèles et orientées vers les pôles de la cellule. Les chromosomes migrent vers le plan équatorial de la cellule et s'attachent aux fibres du fuseau par leur centromère. (figure 3-2d).

L'anaphase. Cette étape commence quand les chromatides soeurs se séparent, chaque membre d'une paire migrant vers un des pôles (figure 3-2e). Le processus de séparation commence par le centromère qui semble lui-même avoir été divisé. Lors de la migration, les deux bras de chaque chromatide s'infléchissent dans le sillage du centromère ; il en résulte deux séries de structures en V pointant vers les pôles.

La télophase. A présent, une enveloppe nucléaire se reforme autour de chaque noyau issu de la division, les chromosomes se déspiralisent et les nucléoles réapparaissent ; tout ceci contribue à recréer des noyaux en interphase (figure 3-2f). A ce stade, le fuseau s'est atrophié et le cytoplasme a été divisé en deux par une nouvelle membrane cellulaire.

Dans chacune des cellules résultantes, le complément chromosomique est identique à celui de la cellule mère. Bien sûr, les structures que nous avions appelées chromatides assument à présent le rôle de chromosomes à part entière.

Message La mitose produit, au départ d'un noyau, deux noyaux identiques de même composition chromosomique que le noyau original.

Le rôle de la chromatine dans la programmation du développement fit l'objet d'un débat très animé à la fin du dix-neuvième siècle et au début du vingtième. L'embryologiste allemand Wilhelm Roux estimait que si les chromosomes jouaient un rôle dans le développement, ils devaient être distribués de façon différente entre les différentes lignées cellulaires. Quand cette opinion s'avéra fausse, l'idée d'un rôle majeur de la chromatine dans le développement fut mise en veilleuse. La conservation intégrale du matériel chromosomique au cours du développement ne fut démontrée que plus tard, lors des premières expériences réussies de transplantation nucléaire.

Comme il leur était devenu évident que le rôle de la mitose etait de maintenir constant le nombre de chromosomes dans chaque noyau, les pionniers de la génétique ne tardèrent pas à relever le paradoxe apparent inhérent à la fertilisation des gamètes l'un par l'autre. Ils savaient en effet qu'au cours de ce processus, les deux noyaux fusionnent, mais que le nombre de chromosomes n'en reste pas moins constant. Qu'est-ce qui empêchait le nombre de chromosomes de doubler à chaque génération ? Ce paradoxe fut levé par la prédiction de l'existence d'un type particulier de division cellulaire qui réduirait de moitié le nombre de chromosomes. Cette division particulière, qui fut finalement découverte dans les tissus producteurs de gamètes des plantes et des animaux, fut appelée méiose.

Méiose

Tout comme la mitose, la méiose est précédée d'une phase S préméiotique au cours de laquelle a lieu la majeure partie de la synthèse d'ADN nécessaire à sa réalisation. (Un peu d'ADN est également synthétisé pendant la première prophase méiotique.) Comme la méiose comporte deux divisions cellulaires, on y distingue une méiose I et une méiose II. Les événements de la méiose I sont très différents de ceux de la méiose II et ces deux groupes d'événements diffèrent également de ceux de la mitose. Chaque division méiotique est divisée formellement en étapes de prophase, de métaphase, d'anaphase et de télophase. De celles-ci, la plus complexe et la plus longue est la prophase I qui est elle-même subdivisée en stades **leptotène, zygotène, pachytène, diplotène** et **diakinèse**. Ici encore, essayez de vous représenter l'enchaînement de ces stades comme un processus dynamique continu, sans interruptions marquées.

Prophase I. STADE LEPTOTENE. C'est à ce stade que les chromosomes deviennent visibles sous la forme de filaments longs et minces (figure 3-3a). La contraction des chromosomes se poursuit au cours du stade leptotène et pendant toute la prophase I. Une autre caractéristique du stade leptotène est l'épaississement de courtes zones des chromosomes, appelées **chromomères**, qui leur donnent l'apparence de colliers de gros grains.

STADE ZYGOTENE. C'est le moment où les chromosomes s'apparient (figure 3-3b) et où il devient évident que le complément chromosomique du méiocyte est constitué en fait de deux jeux complets de chromosomes. Chaque chromosome possède ainsi un partenaire avec lequel il s'apparie latéralement, progressivement, par un processus rappelant le glissement d'une fermeture-éclair. Ils entrent en **synapsis**. Les chromosomes de chaque paire sont dits **homologues** et on parle de **paires d'homologues**. Remarquons que le phénomène d'appariement représente une grande différence par rapport à la mitose, où il n'existe pas. De plus, alors que la mitose se produit dans des cellules ayant un nombre quelconque de chromosomes, la méiose n'a lieu normalement que dans

des cellules possédant deux jeux de chromosomes (deux **génomes**). De telles cellules sont dites **diploïdes** et sont affectées du symbole $2n$, n étant le nombre de chromosomes dans un jeu. Par contre, les cellules qui ne contiennent qu'un jeu de chromosomes sont appelées **haploïdes** (n). Chez les organismes supérieurs comme les mammifères et les plantes, les cellules sont naturellement diploïdes et les méiocytes constituent simplement une sous-population de cellules mises à part pour subir la méiose. Chez les organismes haploïdes, comme nous le verrons plus loin, l'élaboration d'un méiocyte diploïde constitue une des étapes du cycle reproductif normal.

En premier lieu, comment deux chromosomes homologues se retrouvent-ils? Une réponse plausible à cette question est que les extrémités des chromosomes, les **télomères**, sont ancrés dans la membrane nucléaire et que les télomères homologues sont proches l'un de l'autre de telle sorte que le processus d'appariement puisse être initié à la façon du rapprochement des bords d'une fermeture-éclair. En second lieu, comment cette fermeture-éclair fonctionne-t-elle? Bien que le mécanisme précis n'en soit pas compris, un des éléments importants en est la structure complexe, composée d'ADN et de protéines, appelée **complexe synaptonémique** (figure 3-4), que l'on trouve toujours localisée en sandwich entre les homologues durant la synapsis.

STADE PACHYTENE. Les chromosomes ont l'aspect, caractéristique de ce stade, de filaments épais correspondant à la complétion de la synapsis (figure 3-3c). L'appariement complet des homologues ramène à n le nombre d'entités génétiques discrètes dans le noyau. Les nucléoles sont souvent très bien définis à ce stade. Les chromomères, ces épaississements granulaires des chromosomes, sont alignés de façon précise dans les homologues appariés, créant un motif caractéristique pour chaque paire.

STADE DIPLOTENE. Bien que chaque chromosome soit apparu sous la forme d'un filament unique au stade leptotène, l'ADN s'est en fait déjà répliqué pendant la phase S préméiotique. Ceci devient apparent, sous la forme d'un dédoublement longitudinal de chaque homologue apparié (figure 3-3d). Tout comme à la mitose, ces entités, créées par dédoublement longitudinal, sont appelées chromatides. Chaque membre d'une paire d'homologues produit deux chromatides soeurs. Dès lors, chaque structure en synapsis est constituée d'un faisceau de quatre chromatides homologues. Au stade diplotène, l'appariement entre homologues se relâche ; les homologues semblent se repousser mutuellement et, en s'écartant légèrement, révèlent la présence.de structures cruciformes appelées **chiasmas** entre les chromatides «non-soeurs». Chaque paire de chromosomes présente un ou plusieurs chiasmas. Ces chiasmas constituent la manifestation visible d'événements appelés **crossing-over** (enjambements) qui se sont produits plus tôt, probablement pendant les stades zygotène ou pachytène. La formation de crossing-over constitue une des différences essentielles entre la méiose et la mitose (où ils ne se produisent que rarement). Un crossing-over consiste en une cassure égale de deux chromatides non-soeurs, suivie de leur ressoudure croisée précise (breakage - and - reunion). L'étude de lignées d'organismes anormaux, chez qui le crossing-over est peu efficace ou inexistant, révèle des perturbations importantes de l'enchaînement bien ordonné des événements qui président à la répartition des chromosomes dans les cellules issues de la méiose. Le crossing-over joue donc un rôle déterminant dans la disjonction des homologues appariés et la formation d'au moins un crossing-over par paire semble être nécessaire pour une ségrégation correcte. Les crossing-over remplissent une autre fonction extrêmement intéressante qui est de promouvoir la variation génétique en créant de nouvelles combinaisons de gènes. Nous en parlerons au Chapitre 5.

DIAKINESE. Ce stade (figure 3-3e) ne diffère pas sensiblement du stade diplotène, si ce n'est par une contraction encore accrue des chromosomes. A présent, les longs chromosomes filamenteux de l'interphase sont remplacés par des entités compactes, beaucoup plus faciles à manoeuvrer lors des mouvements accompagnant la division méiotique.

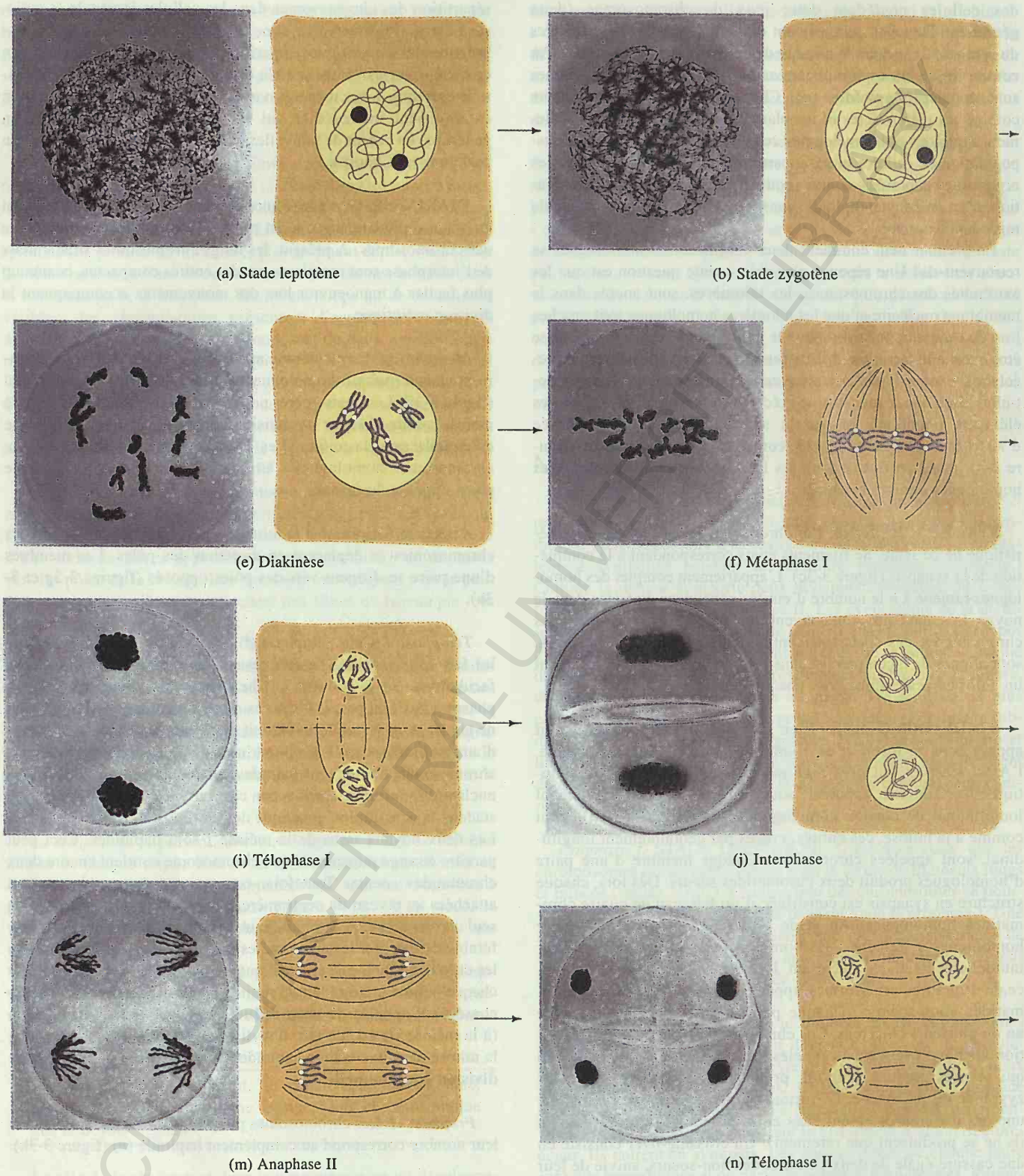
Metaphase I. La membrane nucléaire et les nucléoles ont disparu et chaque paire d'homologues se place dans le plan équatorial (figure 3-3f). Les centromères ne se divisent pas à cette phase de la méiose ; cette absence de division constitue une autre différence essentielle avec la mitose. Les deux centromères d'une paire de chromosomes homologues s'attachent à des fibres provenant de pôles opposés du fuseau.

Anaphase I. Comme à la mitose, l'anaphase débute lorsque les chromosomes se déplacent en direction des pôles. Les membres d'une paire se dirigent vers des pôles opposés (figures 3-3g et 3-3h).

Télophase I. Cette télophase (figure 3-3i) et l'«interphase» qui lui fait suite, appelée **interkinèse** (figure 3-3j), sont des étapes facultatives de la méiose I. Chez beaucoup d'organismes, ces phases n'existent pas, il n'y a pas de reconstitution de la membrane nucléaire et les cellules entrent directement en méiose II. Chez d'autres, la télophase I et l'interkinèse sont des phases brèves ; les chromosomes s'allongent puis deviennent diffus et la membrane nucléaire se reforme. Dans aucun cas il n'y a synthèse d'ADN à ce stade et la constitution génétique des chromosomes ne change pas. Les deux noyaux issus de la méiose I sont haploïdes. Ceci peut paraître étrange puisque chaque chromosome contient encore deux chromatides soeurs. Toutefois, comme ces chromatides restent attachées au niveau du centromère, elles ne comptent que pour un seul chromosome. A ce point, pour observer l'haploïdie, il est préférable de compter les centromères plutôt que les chromosomes ou les chromatides. L'essentiel est que le nombre de chromosomes de chaque cellule a été réduit de moitié. La première division est par conséquent appelée **division réductionnelle**. La seconde division (à la méiose II) est, de fait, une division mitotique et ressemble à la mitose dans une cellule haploïde. Pour cette raison, on l'appelle **division équationnelle.**

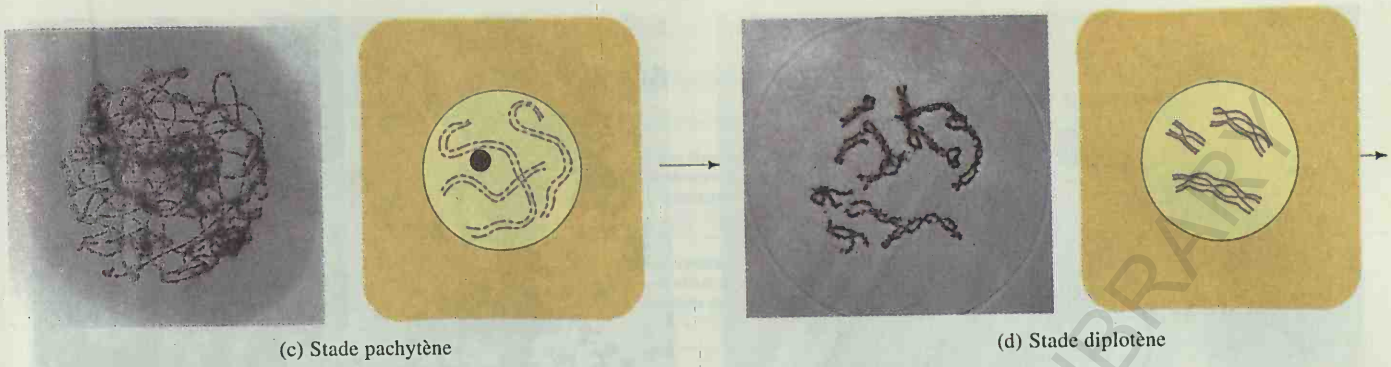
Prophase II. Les chromosomes présentent un aspect contracté et leur nombre correspond au complément haploïde (n) (figure 3-3k).

Métaphase II. Les chromosomes se rangent dans le plan équatorial (figure 3-3l). Souvent, à ce stade, les chromatides s'écartent en partie l'une de l'autre au lieu de rester étroitement accolées comme à la mitose.



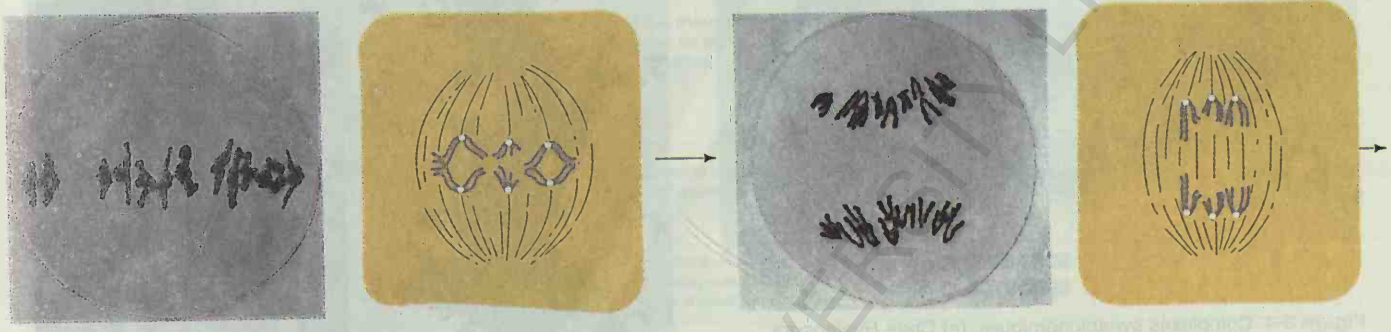
BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 3-3. Méiose et formation du pollen chez *Lilium regale*. (a) Stade leptotène. (b) Stade zygotène. (c) Stade pachytène. (d) Stade diplotène. (e) Diakinèse. (f) Métaphase I. (g) Début d'anaphase I. (h) Fin d'anaphase I. (i) Télophase I. (j) Interphase. (k) Prophase II. (l) Métaphase II. (m) Anaphase II. (n) Télophase II. (o) La tétrade. (p) Jeunes grains de pollen. Note : Par souci de simplicité, les chiasmas n'ont été dessinés qu'entre deux chromatides. En réalité les quatre chromatides peuvent être engagées. (Extrait de J. Mc Leish et B. Snoad, *Looking at Chromosomes*, Copyright 1958, St. Martin's, Macmillan.)



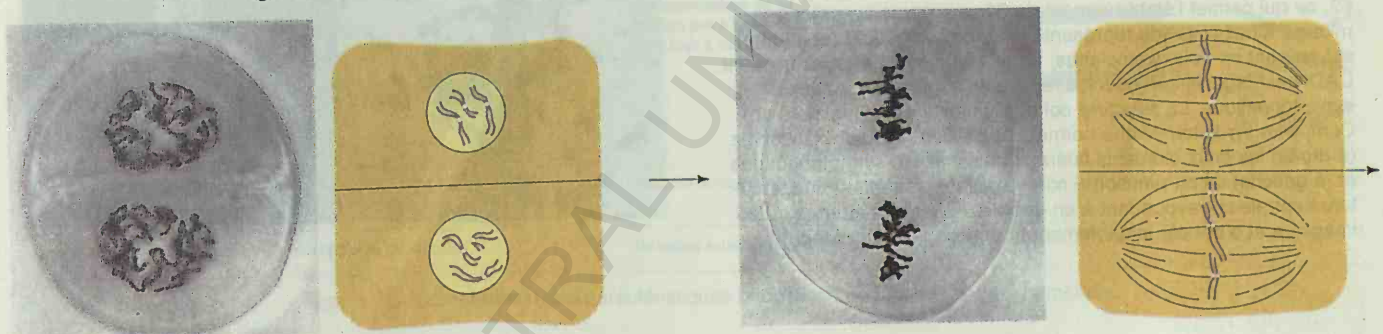
(c) Stade pachytène

(d) Stade diplotène



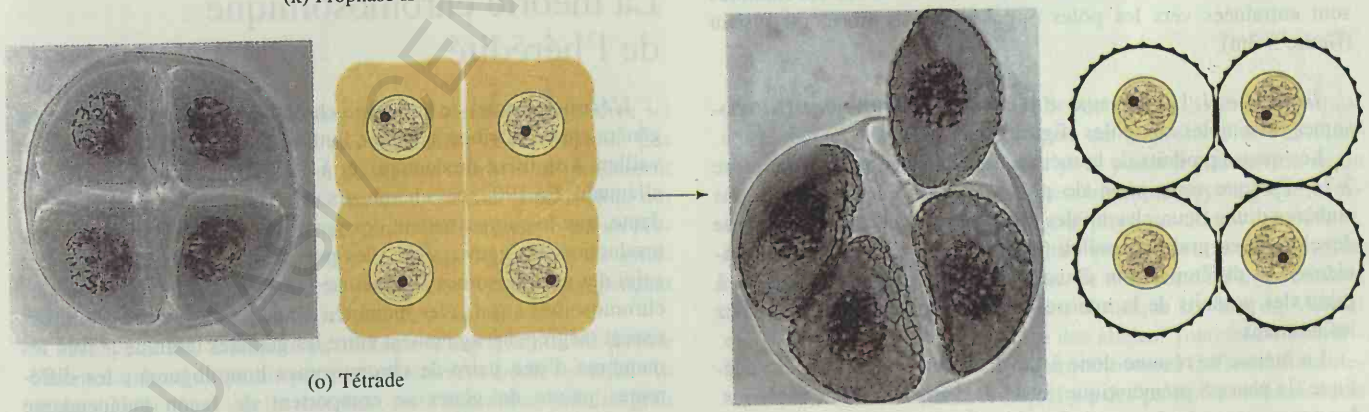
(g) Début d'anaphase I

(h) Fin d'anaphase I



(k) Prophase II

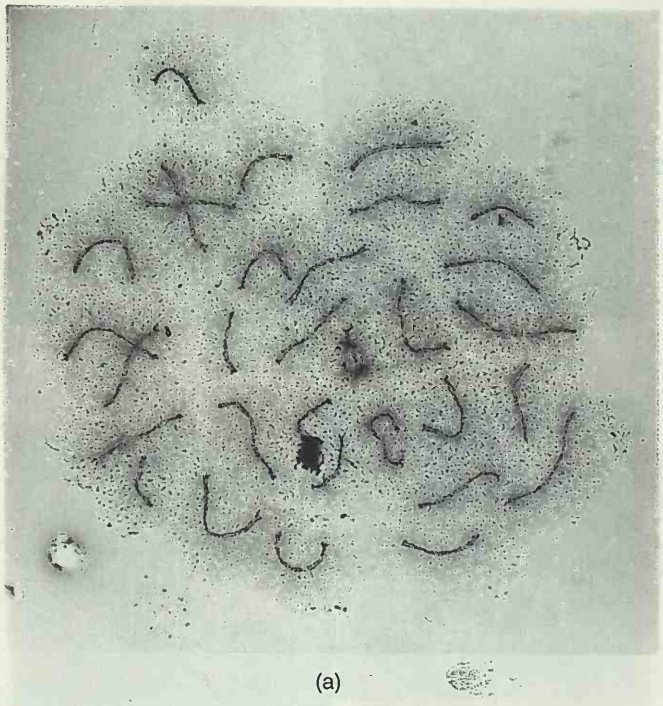
(l) Métaphase II



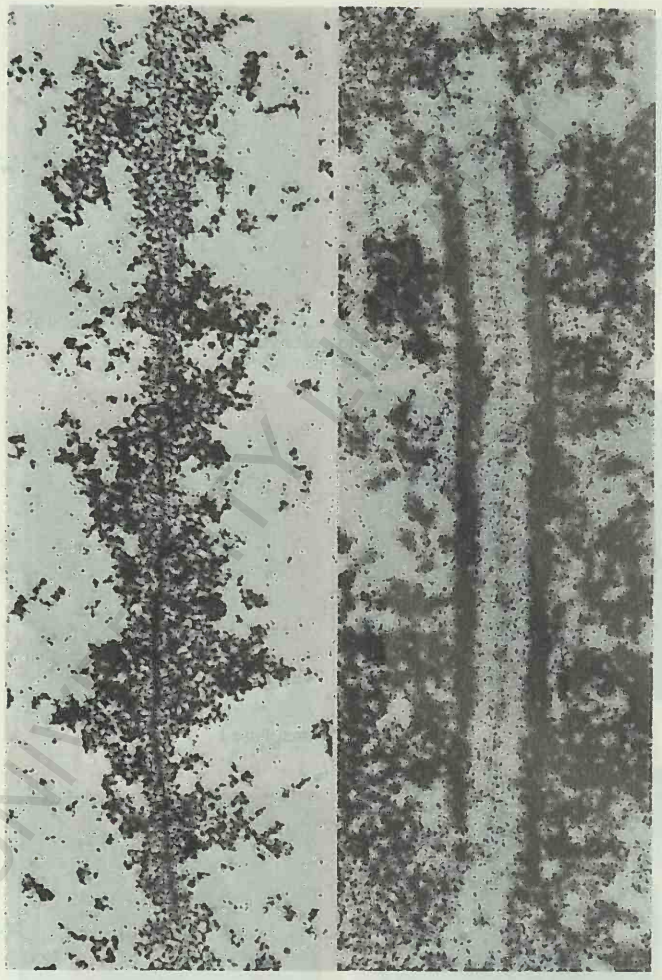
(o) Tétrade

(p) Jeunes grains de pollen

BCU FRIBOURG CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



(a)



(b)

Figure 3-4. Complexes synaptonémiques. (a) Chez *Hyalophora cecropia,* un ver à soie, le nombre normal de chromosomes est de 62, ce qui permet l'établissement de 31 complexes synaptonémiques. Chez l'individu représenté ici, un chromosome (au centre) est présent en trois exemplaires; un tel chromosome est dit trivalent. L'ADN est organisé en boucles régulières autour du complexe synaptonémique. La structure noire très dense est le nucléole. (b) Complexe synaptonémique normal chez *Lilium tyrinum* . Observez (à droite) les deux éléments latéraux du complexe synaptonémique et (à gauche) un chromosome non - apparié, présentant une structure centrale correspondant à un des deux éléments latéraux. (Les images a et b ont été aimablement fournies par Peter Moens.)

Anaphase II. Les centromères sont scindés et les chromatides sont entraînées vers les pôles opposés par les fibres du fuseau (figure 3-3m).

Telophase II. Les noyaux se reconstituent autour des chromosomes rassemblés aux pôles (figure 3-3n).

Les quatre produits de la méiose sont représentés dans la figure 3-3o. Puisque cette série de photos décrit la méiose dans les anthères d'une fleur, chacun des quatre produits de la méiose va se développer en grain de pollen (figure 3-3p). Chez d'autres organismes, la différenciation élabore d'autres types de structures à partir des produits de la méiose, comme les spermatozoïdes chez les animaux.

La méiose se résume donc à un doublement du matériel génétique (la phase S préméiotique) suivi de deux divisions cellulaires. La conséquence logique et inévitable d'un tel schéma est que les produits de la méiose doivent contenir chacun la moitié du matériel génétique du méiocyte original.

Message La méiose se produit toujours dans un méiocyte diploïde et produit quatre gamètes haploïdes.

La figure 3-5 présente un bilan comparatif de la mitose et de la méiose.

La théorie chromosomique de l'hérédité

L'énoncé formel de la théorie chromosomique de l'hérédité est généralement attribué à Walter Sutton, un étudiant américain travaillant à sa thèse de doctorat, et à Theodor Boveri, un biologiste allemand. En 1902, ces chercheurs ont constaté, de façon indépendante, que le comportement des «particules de Mendel» lors de la production des gamètes chez les pois etait exactement parallèle à celui des chromosomes à la méiose : les gènes vont par paires (les chromosomes aussi) ; les membres d'une paire de gènes se répartissent (ségrègent) également entre les gamètes (comme le font les membres d'une paire de chromosomes homologues) ; les différentes paires de gènes se comportent de façon indépendante (comme le font les différentes paires de chromosomes). Ces similitudes sont résumées dans la figure 3-6.

Message Le parallélisme du comportement des gènes et des chromosomes a suggéré que les gènes sont localisés sur les chromosomes.

Nous avons vu au Chapitre I qu'un des objectifs principaux de la génétique est d'intégrer deux forces apparemment opposées qui

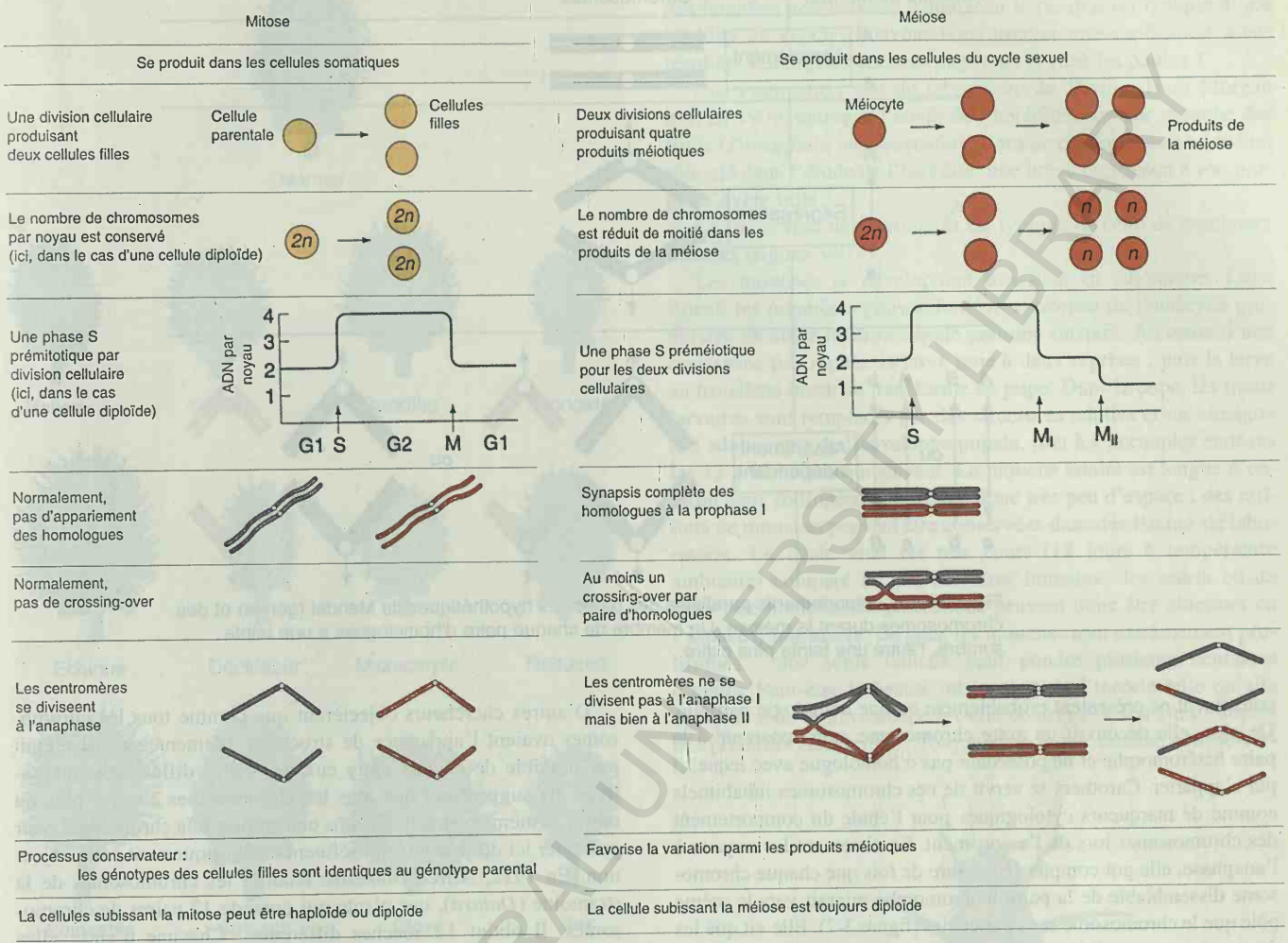


Figure 3-5. Comparaison des caractéristiques principales de la mitose et de la méiose.

gouvernent les processus biologiques : l'hérédité (considérée ici comme la transmission fidèle des caractères) et la variation. Les deux phénomènes de mitose et de méiose fournissent un élément de réponse essentiel : la mitose est un processus conservateur qui maintient un statu quo génétique, tandis que la méiose est un processus générateur d'une variation considérable, mêlant les gènes comme des cartes à jouer, par le jeu de l'assortiment indépendant et (comme nous le verrons plus loin) du crossing-over.

Aux yeux des étudiants en biologie d'aujourd'hui, la théorie chromosomique ne paraît pas particulièrement bouleversante. Au début du vingtième siècle, toutefois, cette hypothèse (qui intégrait de fait la cytologie et la discipline naissante qu'était la génétique) fit l'effet d'une bombe. Bien sûr, la première réaction à une hypothèse aussi importante fut d'essayer d'en trouver les points faibles. Pendant des années, la controverse fit rage à propos de la validité de ce qui est devenu la théorie chromosomique de l'hérédité de Sutton et Boveri.

Il est intéressant d'examiner quelques unes des objections formulées à l'encontre de la théorie de Sutton et Boveri. Par exemple, on ne pouvait, à l'époque, déceler les chromosomes à l'interphase (entre les divisions cellulaires). Boveri dut se livrer à une étude extrêmement attentive et soigneuse de la position des chromosomes avant et après l'interphase pour pouvoir soutenir de façon convaincante que les chromosomes, bien que «cytologiquement» invisibles, conservaient leur intégrité physique durant cette phase. D'aucuns firent également remarquer que tous les chromosomes de certains organismes se ressemblent, de telle sorte qu'ils pourraient fort bien s'apparier arbitrairement, alors que les lois de Mendel exigent une ségrégation ordonnée des allèles. Toutefois, il se vérifia que chez des espèces où les chromosomes diffèrent sensiblement par la taille et par la forme, il y a des paires de chromosomes semblables et que les homologues s'apparient et ségrègent à la méiose.

En 1913, Elinor Carothers découvrit une situation chromosomique inhabituelle chez certaines sauterelles, une situation qui permettait de déterminer de façon directe si différentes paires de chromosomes ségrègeaient bien indépendamment. En étudiant les testicules de ces sauterelles, elle découvrit une paire de chromosomes non-strictement identiques bien que capables d'établir une synapsis ; une telle paire est dite **hétéromorphe** et les chromosomes qui la

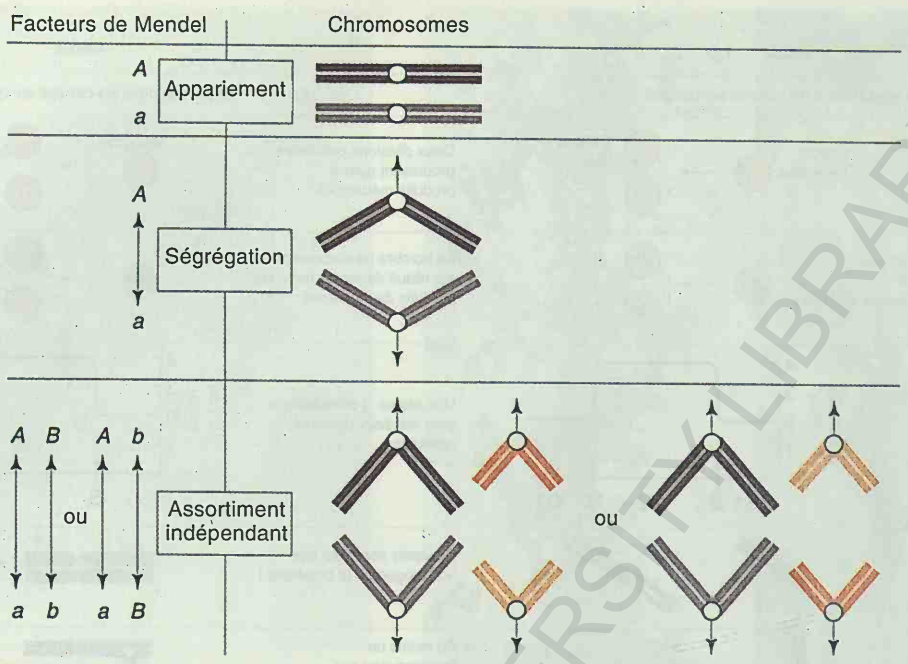


Figure 3-6. Comportements parallèles des particules hypothétiques de Mendel (gènes) et des chromosomes durant la méiose. Un membre de chaque paire d'homologues a une teinte sombre, l'autre une teinte plus claire.

constituent ne présentent probablement qu'une homologie partielle. De plus, elle découvrit un autre chromosome, non apparenté à la paire hétéromorphe et ne possédant pas d'homologue avec lequel il put s'apparier. Carothers se servit de ces chromosomes inhabituels comme de marqueurs cytologiques pour l'étude du comportement des chromosomes lors de l'assortiment. En observant les noyaux à l'anaphase, elle put compter le nombre de fois que chaque chromosome dissemblable de la paire hétéromorphe migrait vers le même pôle que le chromosome sans partenaire (figure 3-7). Elle vit que les deux schémas possibles de migration chromosomique se produisaient avec la même fréquence. Bien que le comportement de chromosomes inhabituels ne puisse être considéré comme rigoureusement typique, les résultats suggèrent néanmoins que des chromosomes non homologues se réassortissent de façon indépendante.

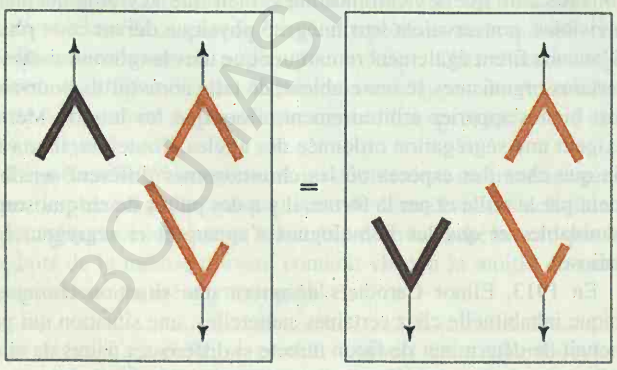


Figure 3-7. Les deux schémas de ségrégation possibles d'une paire hétéromorphe et d'un chromosome non - apparié dans les gamètes, tels qu'observés par Carothers.

D'autres chercheurs objectèrent que comme tous les chromosomes avaient l'apparence de structures filamenteuses, il n'était pas possible de déceler entre eux de réelles différences qualitatives. Ils suggérèrent que tous les chromosomes eussent plus ou moins le même contenu. Faisons une entorse à la chronologie pour présenter ici des travaux qui réfutent catégoriquement cette objection. En 1922, Alfred Blakeslee étudiait les chromosomes de la stramoine (*Datura*), une plante qui possède 12 paires de chromosomes. Il obtint 12 souches différentes. Chacune d'entre elles avait, en plus des 12 paires de chromosomes normales, un exemplaire supplémentaire d'un chromosome d'une des paires. Blakeslee montra que chaque souche était distincte phénotypiquement (figure 3-8). On ne s'attendrait pas à ce résultat si les chromosomes non homologues étaient tous semblables.

Tous ces résultats indiquaient que le comportement des chromosomes et celui des gènes étaient étroitement parallèles. Celà rendait la théorie de Sutton et Boveri extrêmement attrayante, mais il n'existait pas encore de preuve véritable que les gènes fussent localisés sur les chromosomes. D'autres observations en fournirent la preuve.

La découverte de la liaison au sexe

Dans les croisements discutés jusqu'à présent, le sexe du parent appartenant à l'une ou à l'autre souche est sans importance. Des croisements réciproques (tels que souche A ♀ X souche B ♂ et souche A ♂ X souche B ♀) produisent des descendances identiques. La première exception à ce schéma fut découverte en 1906 par L. Doncaster et G.H. Raynor. Ils étudiaient la couleur de l'aile chez un papillon, la Phalène du groseiller (*Abraxas*) en utilisant deux lignées différentes : une lignée à ailes claires et une à ailes foncées. Lorsque des femelles à ailes claires sont croisées avec des mâles à ailes sombres, toute la descendance a des ailes sombres, ce qui montre que l'allèle ailes claires est récessif. Toutefois, dans la progéniture du croisement réciproque (femelle sombre × mâle

BOUASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

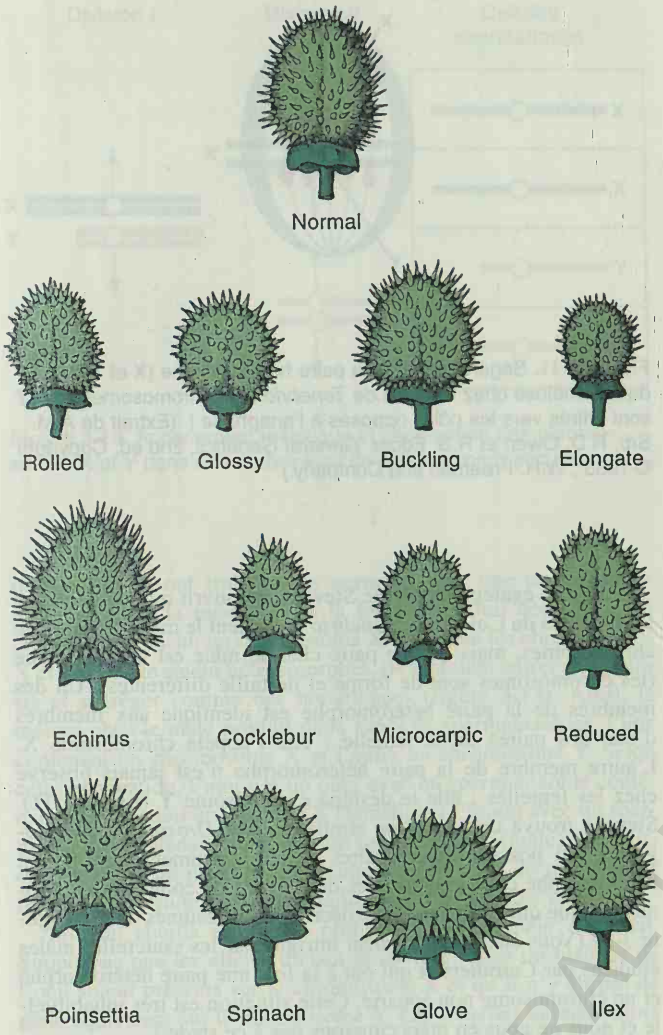


Figure 3-8. Fruits de *Datura* , possédant chacun un chromosome surnuméraire différent. Leurs aspects caractéristiques suggèrent que chaque chromosome exerce un effet qui lui est propre. (N.d.T. : les dénominations anglo - saxonnes, difficilement traduisibles, ont été conservées.) (Extrait de E.W. Sinnott, L.C. Dunn et T. Dobzhansky, *Principles of Genetics*, 5th ed. McGraw - Hill Book Cy.)

clair), toutes les femelles ont les ailes claires et les mâles ont les ailes sombres. Cette paire de croisements réciproques ne donne donc pas les mêmes résultats et les phénotypes des ailes, dans le second croisement, sont associés au sexe des papillons. Observez que les femelles issues de ce second croisement sont phénotypiquement semblables à leur père et les mâles à leur mère. Ceci est parfois appelé **hérédité en zigzag**. Comment expliquer ces résultats ? Avant de nous livrer à une tentative d'explication, prenons un autre exemple.

Willliam Bateson étudiait la transmission du motif du plumage chez les poules. Une des lignées avait des plumes présentant une alternance de bandes sombres et claires, un phénotype appelé «barré». Une autre lignée, «non-barrée», avait des plumes de couleur uniforme. Lors du croisement mâle barré X femelle non-barrée, toute la progéniture etait barrée, ce qui établissait la récessivité de l'allèle non-barré. Toutefois, le croisement réciproque (femelle barrée X mâle non-barré) produisait des mâles barrés et des femelles non-barrées. A nouveau le résultat est typique d'une hérédité en zigzag. Pouvons-nous trouver une explication à ces résultats semblables chez les papillons et chez les poules ?

Une explication vint du laboratoire de Thomas Hunt Morgan qui, en 1909, entreprit l'étude de l'hérédité chez une mouche des fruits (*Drosophila melanogaster*). Comme cet organisme a joué un rôle-clé dans l'étude de l'hérédité, une brève digression à son propos s'avère utile.

Le cycle vital de *Drosophila* est typique de celui de nombreux insectes (figure 3-9).

Les mouches se développent très bien en laboratoire. Dans l'oeuf, les premières phases du développement de l'embryon produisent un stade larvaire appelé premier «instar». Au cours d'une croissance très rapide, la larve mue à deux reprises , puis la larve au troisième instar se transforme en pupe. Dans la pupe, les tissus larvaires sont remplacés par des structures adultes et un «imago» (ou adulte) sort de l'enveloppe pupale, prêt à s'accoupler endéans les 12 à 14 heures qui suivent. La mouche adulte est longue d'environ deux millimètres et occupe donc très peu d'espace : des milliers de mouches peuvent être conservées dans des flacons de laboratoire. Le cycle vital est très court (12 jours à température ambiante) comparé à ceux des êtres humains, des souris ou du maïs ; de nombreuses générations peuvent donc être obtenues en l'espace d'une année. De plus, les mouches sont extrêmement prolifiques : une seule femelle peut pondre plusieurs centaines d'oeufs. Peut-être la beauté intrinsèque de l'insecte telle qu'elle apparaît sous le microscope a-t-elle contribué à son attrait auprès des premiers généticiens ? Toujours est-il que, comme nous le ver-

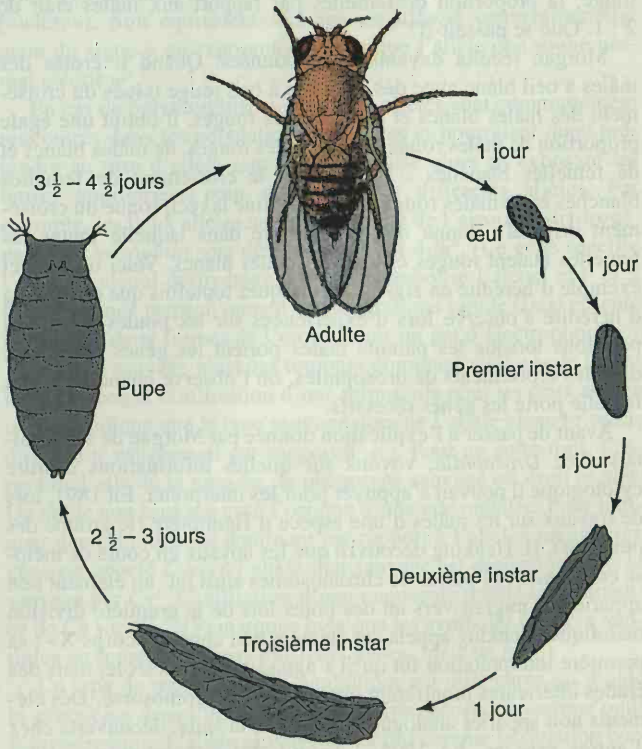


Figure 3-9. Cycle de vie de *Drosophila melanogaster*, la mouche des fruits commune (ou mouche du vinaigre).

Figure 3-10. Oeil rouge (sauvage) et oeil blanc de *Drosophila*. (Carolina Biological Supply)

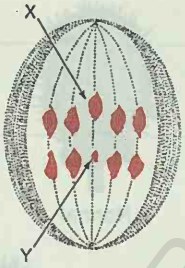


Figure 3-11. Ségrégation de la paire hétéromorphe (X et Y) pendant la méiose chez un mâle de *Tenebrio*. Les chromosomes X et Y sont attirés vers les pôles opposés à l'anaphase I. (Extrait de A.M. Srb, R.D. Owen et R.S. Edgar, *General Genetics*, 2nd ed. Copyright © 1965 , W.H. Freeman and Company.)

rons, le choix de *Drosophila* s'avéra extrêmement heureux, en particulier pour Morgan, dont les travaux furent couronnés par un prix Nobel en 1934.

La couleur normale de l'oeil de *Drosophila* est rouge vif. Très tôt, Morgan découvrit un mâle aux yeux complètement blancs (figure 3-10). En croisant ce mâle avec des femelles à oeil rouge, il obtint une descendance F1 homogène à oeil rouge, ce qui indiquait que l'allèle blanc etait récessif. En croisant entre eux les mâles et les femelles F1 à oeil rouge, Morgan obtint des mouches à oeil rouge et à oeil blanc dans un rapport 3 : 1, mais toutes les mouches à oeil blanc étaient mâles. Parmi les mouches à oeil rouge, la proportion de femelles par rapport aux mâles était de 2 : 1. Que se passait-il?

Morgan récolta davantage de données. Quand il croisa des mâles à oeil blanc avec des femelles à oeil rouge issues du croisement des mâles blancs et des femelles rouges, il obtint une égale proportion de mâles rouges, de femelles rouges, de mâles blancs et de femelles blanches . Finalement, le croisement de femelles blanches et de mâles rouges (qui constitue la réciproque du croisement original), donna une progéniture dans laquelle toutes les femelles étaient rouges et tous les mâles blancs. Voici un nouvel exemple d'hérédité en zigzag. Remarquez toutefois que ce schéma d'hérédité s'observe lors d'expériences sur les poules et sur les papillons lorsque les parents mâles portent les gènes récessifs ; dans les croisements de drosophiles, on l'observe quand le parent femelle porte les gènes récessifs.

Avant de passer à l'explication donnée par Morgan de ses résultats avec *Drosophila*, voyons sur quelles informations d'ordre cytologique il pouvait s'appuyer pour les interpréter. En 1891, lors de travaux sur les mâles d'une espèce d'Hémiptère (le groupe des punaises), H. Henking découvrit que les noyaux en cours de méiose contenaient 11 paires de chromosomes ainsi qu' un élément non apparié qui migrait vers un des pôles lors de la première division méiotique. Henking appela cet élément non apparié «corps X» ; sa première interprétation fut qu'il s'agissait d'un nucléole, mais des études ultérieures montrèrent que c'était un chromosome. Des éléments non appariés analogues furent, par la suite, découverts chez d'autres espèces. En 1905, Edmond Wilson remarqua que les femelles de *Protenor* (un autre Hémiptère) ont sept paires de chromosomes, alors que les mâles en ont six, plus un chromosome non apparié, que Wilson appela (par analogie) chromosome X. En fait, les femelles ont une paire de chromosomes X.

En 1905 également, Nettie Stevens découvrit que les mâles et les femelles du Coléoptère *Tenebrio* possèdent le même nombre de chromosomes, mais qu'une paire chez le mâle est hétéromorphe (les chromosomes sont de forme et de taille différentes). Un des membres de la paire hétéromorphe est identique aux membres d'une des paires de la femelle ; elle l'appela chromosome X. L'autre membre de la paire hétéromorphe n'est jamais observé chez les femelles ; elle le désigna chromosome Y (figure 3-11). Stevens trouva une situation similaire chez *Drosophila melanogaster*, qui possède quatre paires de chromosomes dont une est hétéromorphe chez le mâle. Les deux types de composition chromosomique qui viennent d'être décrites sont résumés dans la figure 3-12.(Vous êtes probablement intrigué par les sauterelles mâles étudiées par Carothers et qui ont à la fois une paire hétéromorphe et un chromosome non apparié. Cette situation est très inhabituelle et nous ne nous en préoccuperons pas à ce stade.)

En s'aidant de cette information, Morgan élabora une interprétation de ses résultats génétiques. Tout d'abord, il ressort que les chromosomes X et Y déterminent le sexe de la mouche. Les femelles de Drosophile ont quatre paires de chromosomes tandis

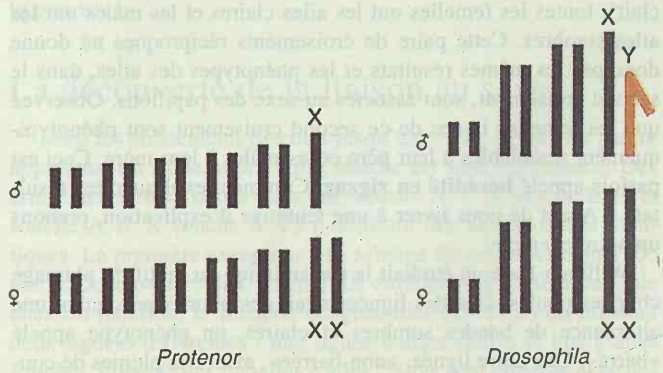


Figure 3-12. La garniture chromosomique des mâles et des femelles chez deux espèces d'insectes.

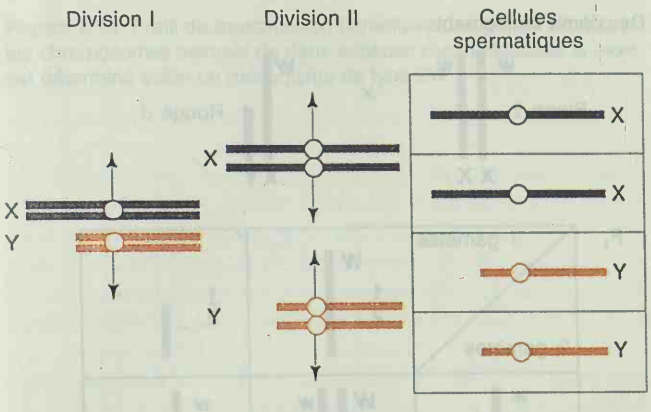


Figure 3-13. Appariement méiotique et ségrégation des chromosomes X et Y dans un nombre égal de cellules spermatiques.

que les mâles ont trois paires normales plus une paire hétéromorphe. Donc la méiose chez la femelle produit des oeufs qui contiennent chacun un chromosome X. Bien que les chromosomes X et Y du mâle soient hétéromorphes, ils semblent entrer en synapsis et ségréger comme des homologues (figure 3-13). Ainsi, la méiose chez le mâle produit deux types de spermatozoïdes, l'une contenant un chromosome X et l'autre un chromosome Y. Selon cette explication, l'union d'un oeuf avec un spermatozoïde contenant un X produit un zygote XX (femelle) et l'union avec un spermatozoïde contenant un Y produit un zygote XY (mâle). De plus, on s'attend à un nombre approximativement égal de mâles et de femelles, à la suite de la ségrégation égale de X et de Y.

Morgan aborda ensuite le problème de la couleur de l'oeil. Supposons que les allèles dictant la couleur rouge ou blanche de l'oeil soient présents sur le chromosome X et qu'il n'y ait pas de gène équivalent sur le chromosome Y. Les femelles auraient alors deux exemplaires de ce gène et les mâles un seul. Cette situation hypothétique, quoiqu'inattendue, s'avère pourtant correspondre à la réalité. Dans le croisement initial du mâle à oeil blanc avec les femelles à oeil rouge, toute la descendance F1 avait les yeux rouges, ce qui montrait que le gène «yeux rouges» est dominant. Donc, nous pouvons représenter les deux allèles par *W* (rouge) et *w* (blanc) et nous pouvons schématiser les deux croisements réciproques comme nous le montrons dans la figure 3-14.

Cette figure montre que les résultats génétiques des deux croisements réciproques s'accordent parfaitement avec ce que l'on sait du comportement méiotique des chromosomes X et Y. Cette expérience constitue un solide argument en faveur de la localisation chromosomique des gènes. Toutefois, il ne s'agit que d'une corrélation et non d'une preuve absolue de la théorie de Sutton et Boveri.

La même hypothèse au sujet des chromosomes XX et XY peut-elle être appliquée à l'interprétation des résultats obtenus antérieurement lors de croisements de poules et de papillons? Nous nous rendons compte que ce n'est pas le cas. Toutefois, Richard Goldschmidt s'aperçut immédiatement que ces résultats étaient explicables sur la base d'une hypothèse analogue : il suffisait de supposer que ce sont les mâles qui ont des paires de chromosomes identiques et les femelles qui ont une paire hétéromorphe. Pour distinguer cette situation de celle de X et Y chez *Drosophila*, Morgan suggéra que les chromosomes hétéromorphes des poules et des papillons soient appelés W et Z, les mâles étant ZZ et les femelles WZ. Si des gènes se trouvent sur le chromosome Z, les croisements de poules ou de papillons peuvent être représentés schématiquement comme dans la figure 3-15.

Ici aussi, cette interprétation est en accord avec les données génétiques. En outre, des observations cytologiques ont confirmé l'hypothèse génétique. En 1914, J. Seiler vérifia que les deux chromosomes de chaque paire sont identiques chez les papillons mâles alors que les femelles possèdent une paire hétéromorphe.

Message Le mode de transmission héréditaire de certains gènes est tel qu'il est extrêmement probable qu'ils se trouvent sur les chromosomes déterminant le sexe, qui présentent le même mode de transmission.

Une parenthèse à propos des symboles génétiques.

Un symbolisme spécial fut introduit pour définir, chez *Drosophila*, les allèles variants par rapport à l'allèle «normal». Ce système est à présent utilisé par de nombreux généticiens et facilite considérablement l'analyse génétique. Pour un trait donné de *Drosophila*, l'allèle le plus fréquemment rencontré dans les populations naturelles (ou l'allèle présent dans les souches de référence des laboratoires) sert de référence et est désigné comme l'allèle «sauvage». Tous les autres allèles sont dès lors non sauvages. La désignation symbolique d'un gène est basée sur le premier allèle non sauvage identifié. Dans les expériences de Morgan, il s'agissait d'yeux blancs, donc l'allèle non sauvage est symbolisé par *w* («white»). Son équivalent sauvage est affecté conventionnellement du signe + en exposant, de sorte que l'allèle oeil rouge normal s'écrit w^+.

En cas de polymorphisme, plusieurs allèles sont communément rencontrés dans les populations naturelles et pourraient donc prétendre au titre d'allèle sauvage. On utilise alors en exposant les lettres appropriées pour distinguer les différents allèles. Par exemple, les deux allèles naturels du gène de l'alcool déshydrogénase de *Drosophila* sont désignés Adh^F et Adh^S. (Ce gène spécifie l'enzyme alcool déshydrogenase qui métabolise l'alcool et F et S font référence respectivement aux migrations rapide (fast) et lente (slow) des deux formes de l'enzyme sur un gel d'électrophorèse.)

L'allèle sauvage n'est pas toujours dominant vis-à-vis de l'allèle non sauvage. L'utilisation d'une minuscule pour les deux allèles *w* et w^+ indique que le type sauvage domine l'allèle blanc (c'est-à-dire que *w* est récessif par rapport à w^+). Pour un autre trait, l'aspect de l'aile de la mouche, le phénotype sauvage est droit et plat. Un allèle non sauvage est à l'origine d'une aile ondulée. Pour indiquer que cet allèle est dominant par rapport à l'allèle sauvage, (ce gène est appelé *Curly*), l'allèle non sauvage est désigné par *Cy*, le sauvage par Cy^+. L'utilisation d'une majuscule reflète la dominance de *Cy* sur Cy^+. (Remarquez bien que les symboles à lettres multiples ne représentent pas plusieurs gènes, mais un seul.)

Ce type de représentation symbolique est utile parce qu'il aide le généticien dans l'utilisation de l'analyse génétique comme outil d'investigation. L'allèle sauvage est défini comme la situation correspondant à un fonctionnement normal de l'organisme et les allèles non sauvages (qu'ils soient récessifs ou dominants) peuvent

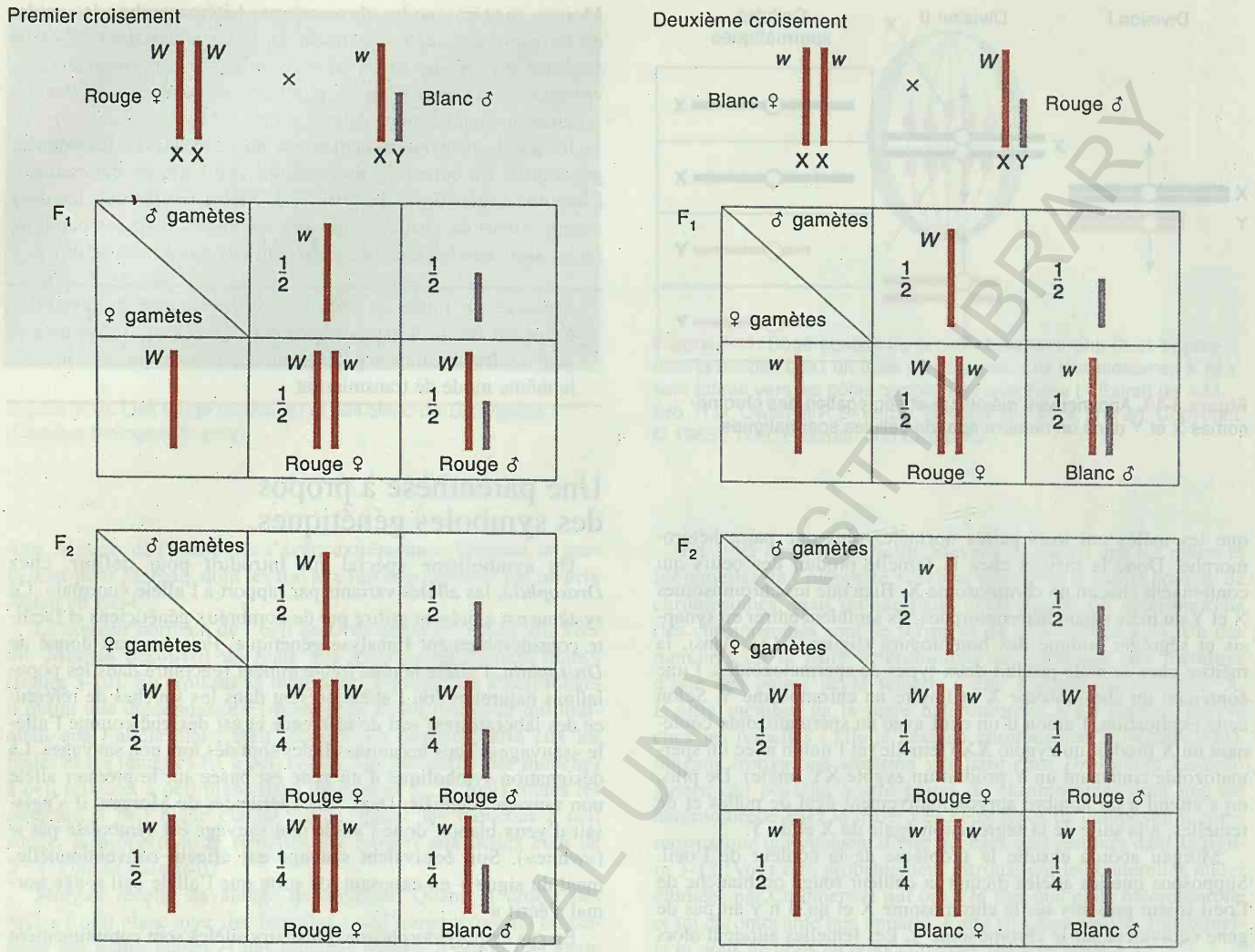


Figure 3-14. Explication des résultats différents obtenus dans des croisements réciproques entre drosophiles à oeil rouge et à oeil blanc.

être assimilés à des situations anormales. Les allèles anormaux deviennent alors des sondes permettant d'appréhender les fonctionnements normaux en examinant les façons dont ils peuvent parfois mal fonctionner. La plupart des généticiens qui utilisent l'analyse génétique comme méthode d'exploration des processus biologiques se servent de ce type de symbolisme. Soulignons que la notation de Mendel (*A* et *a*, ou *B* et *b*) ne définit ni ne souligne la norme. Pour une fleur de pois, par exemple, est-ce la couleur blanche ou la pourpre qui est normale? Toutefois, le symbolisme mendélien est utile dans certaines applications ; il est largement utilisé dans la culture et la production d'hybrides de plantes et d'animaux.

La preuve de la théorie chromosomique.

Des corrélations existant entre le comportement des gènes et des chromosomes, il apparaissait comme très vraisemblable que les gènes fussent des parties de chromosomes. Mais celles-ci ne constituaient pas une preuve absolue de la théorie chromosomique et le débat s'éternisait. La preuve irréfutable de l'exactitude de la théorie de Sutton et Boveri fut fournie par un des élèves de Morgan, Calvin Bridges.

Les travaux de Bridges débutèrent par le croisement de *Drosophila* que nous avons analysé précédemment, représenté dans notre nouveau symbolisme comme X^wX^w (♀ blanche) × $X^{w+}Y$ (♂ rouge). Nous savons que la progéniture attendue est $X^{w+}X^w$ (♀ rouges) et X^wY (♂ blancs). Toutefois, Bridges découvrit que de rares exceptions apparaissent quand le croisement est pratiqué à grande échelle. Un descendant F1 sur 2000 environ est une femelle à oeil blanc ou un mâle à oeil rouge. Dans leur ensemble, ces individus sont appelés **descendants exceptionnels de la première génération.** Tous les mâles exceptionnels de la première génération s'avérèrent stériles. Toutefois, quand Bridges croisa les rares femelles à oeil blanc de la première génération avec des mâles normaux à oeil rouge, 4 pour cent de la descendance s'avérèrent être des femelles à oeil blanc et des mâles à oeil rouge qui étaient fertiles. Il obtenait donc à nouveau des descendants atypiques, mais à une fréquence plus élevée et cette fois, les mâles étaient fertiles. Cette progéniture atypique de mères elles-mêmes atypiques de la première génération est appelée **descendance exceptionnelle de la deuxième génération** (figure 3-16). Comment expliquer cette progéniture exceptionnelle?

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 3-15. Profil de transmission héréditaire des gènes situés sur les chromosomes sexuels de deux espèces chez lesquelles le sexe est déterminé selon un mécanisme de type ZW.

Poules				
Premier croisement	P	Z^BZ^B mâles barrés	×	Z^bW femelles non barrées
	F1	Z^BZ^b mâles barrés		Z^BW femelles barrées
Second croisement (réciproque du premier)	P	Z^bZ^b mâles non barrés	×	Z^BW femelles barrées
	F1	Z^BZ^b mâles barrés		Z^BW femelles non barrées
Papillons				
Premier croisement	P	Z^LZ^L mâles sombres	×	Z^lW femelles claires
	F1	Z^LZ^l mâles sombres		Z^LW femelles sombres
Second croisement (réciproque du premier)	P	Z^lZ^l mâles clairs	×	Z^LW femelles sombres
	F1	Z^lZ^L mâles sombres		Z^lW femelles claires

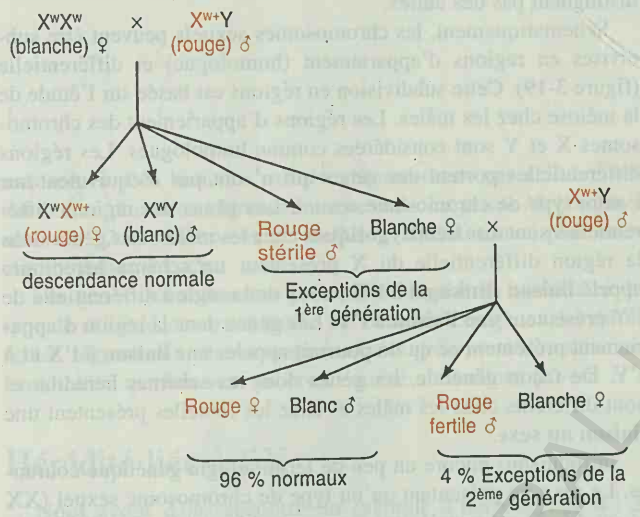


Figure 3-16. Croisements de *Drosophila* à partir desquels furent obtenus les descendants exceptionnels de première et de deuxième générations. *Rouge*, oeil rouge; *Blanc(he)*, oeil blanc.

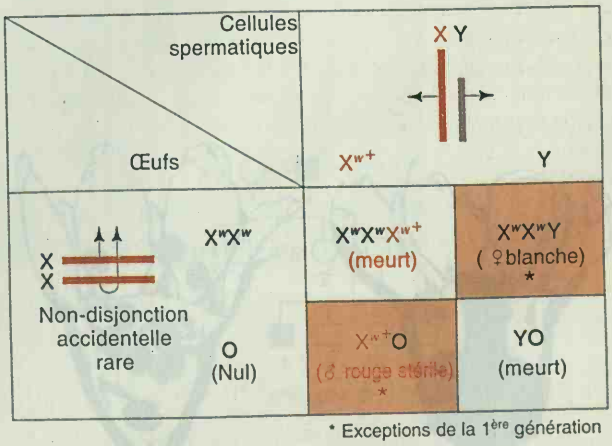
Il va de soi que les femelles exceptionnelles-qui, comme toutes les femelles ont deux chromosomes X-doivent hériter ces deux chromosomes de leur mère, puisqu'elles sont homozygotes pour *w*. De même, les mâles exceptionnels doivent hériter leur chromosome X de leur père, puisqu'ils portent l'allèle w^+. Bridges émit l'hypothèse que de rares accidents se produisent à la méiose chez la femelle, à la suite desquels les chromosomes X appariés ne ségrègent ni à la première ni à la seconde division. Il en résulterait des noyaux méiotiques contenant soit deux chromosomes X soit aucun. Une telle absence de ségrégation est appelée **non-disjonction** ; elle produit un noyau XX et un noyau X-nul (celui dépourvu de chromosome X). La fécondation de tels noyaux va produire quatre classes zygotiques (figure 3-17). Remarquez bien que chaque trait représentant un chromosome dans ce diagramme représente de fait une paire de chromatides soeurs.

Si nous supposons que les zygotes XXX et YO meurent avant que leur développement soit achevé, les deux types de descendants exceptionnels doivent révéler à l'examen les compositions chromosomiques respectives suivantes : X^wX^wY (♀ blanches) et $X^{w+}O$ (♂ rouges stériles). Remarquez que le modèle de Bridges considère implicitement que le sexe chez *Drosophila* est déterminé non par la présence ou l'absence du chromosome Y, mais par le nombre de chromosomes X. Dans la majorité des cas, deux chromosomes X déterminent une femelle ; un X détermine un mâle. Qu'en est-il de la stérilité des mâles exceptionnels de la première génération? Elle est explicable si nous supposons que le chromosome Y est indispensable pour la fertilité du mâle.

En résumé, Bridges expliqua les descendants exceptionnels de la première génération en postulant l'existence de méioses peu fréquentes produisant des femelles XXY et des mâles XO viables. Il vérifia expérimentalement ce modèle de différentes façons.

D'abord, il fit l'analyse microscopique des chromosomes des descendants exceptionnels de la première génération (que nous avons identifiés sur des bases génétiques) et montra qu'ils étaient du type prédit.

Ensuite, il prédit les appariements chromosomiques possibles à la méiose chez les femelles XXY et la composition chromosomique des descendants exceptionnels qui en seraient issus à la seconde génération. Cette fois aussi, l'examen microscopique confirma cette prédiction.



* Exceptions de la 1ère génération

Figure 3-17. Explication proposée de l'origine de la descendance exceptionnelle de la première génération, basée sur la non - disjonction des chromosomes X chez le parent maternel. *Rouge*, oeil rouge; *Blanc(he)*, oeil blanc.

Ainsi, Bridges vérifia expérimentalement toutes les prédictions basées sur la double hypothèse que *w* et w^+ sont bien sur le chromosome X et qu'un phénomène inexpliqué de non-disjonction se produit avec une fréquence faible lors de certaines méioses. Ces confirmations constituent la preuve univoque que les gènes sont associés aux chromosomes et qu'ils sont même probablement des segments de chromosomes.

Message Lorsque Bridges utilisa la théorie chromosomique pour prédire avec succès l'origine de certaines bizarreries génétiques, la localisation chromosomique des gènes fut établie de manière indubitable.

Chromosomes sexuels et liaison au sexe

Les êtres humains, comme tous les mammifères, présentent également un mécanisme de détermination du sexe de type X-Y, avec des mâles XY et des femelles XX. Contrairement à la situation chez *Drosophila*, c'est la présence du chromosome Y qui détermine le caractère mâle chez les humains. Cette différence est mise en lumière par les phénotypes sexuels des types chromosomiques anormaux XXY et XO (tableau 3-1). Nous n'aborderons une discussion approfondie de ce point que dans le chapitre 9.

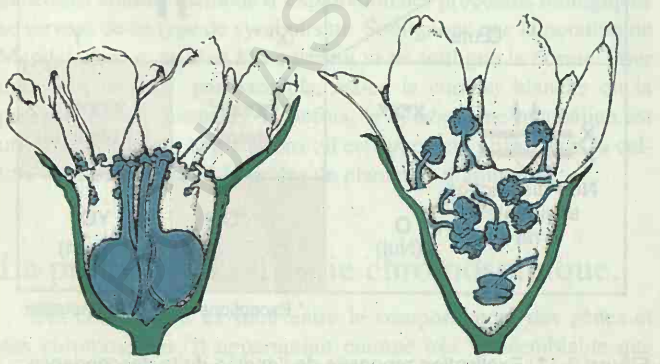
Les plantes supérieures présentent une diversité de situations sexuelles. Certaines espèces portent les organes sexuels mâles et femelles sur la même plante, parfois combinés dans la même fleur. Ces espèces sont dites **hermaphrodites** (la rose en est un exemple). Les espèces où les organes sexuels mâles et femelles se trouvent dans des fleurs distinctes sur la même plante sont appelées espèces **monoïques** (comme le maïs, par exemple). Les espèces **dioïques** présentent des plantes de sexe distinct, les plantes femelles portant des fleurs qui ne contiennent que des ovaires, et les plantes mâles, des fleurs qui ne contiennent que des anthères (figure 3-18). Certaines plantes dioïques mais pas toutes, possèdent une paire de chromosomes hétéromorphes associée au sexe (et presque certainement impliquée dans sa détermination). Parmi les espèces à chromosomes sexuels hétéromorphes, une large proportion présente un système de type X-Y. Des expériences critiques menées chez quelques espèces suggèrent un système du type *Drosophila*. Certaines plantes dioïques ne possèdent pas de paires de chromosomes hétéromorphes discernables ; elles peuvent néanmoins avoir des chromosomes sexuels, mais alors ils ne se distinguent pas des autres.

Schématiquement, les chromosomes sexuels peuvent être subdivisés en régions d'appariement (homologue) et différentielle (figure 3-19). Cette subdivision en régions est basée sur l'étude de la méiose chez les mâles. Les régions d'appariement des chromosomes X et Y sont considérées comme homologues. Les régions différentielles portent des gènes qui n' ont pas d'équivalent sur l'autre type de chromosome sexuel. Les gènes des régions différentielles sont dits **hémizygotiques** chez les mâles. Les gènes dans la région différentielle du X présentent un schéma héréditaire appelé **liaison (linkage) à l'X** ; ceux de la région différentielle de l'Y présentent une **liaison à l'Y**. Les gènes dans la région d'appariement présentent ce qu'on pourrait appeler une **liaison à l'X et à l'Y.** De façon générale, les gènes dont les schémas héréditaires sont différents chez les mâles et chez les femelles présentent une **liaison au sexe.**

Introduisons encore un peu de terminologie génétique courante. Le sexe ne présentant qu'un type de chromosome sexuel (XX ♀ ou ZZ ♂) est appelé sexe **homogamétique** ; l'autre (XY ♂ ou ZW♀) est appelé sexe **hétérogamétique.** Par conséquent, les mâles de l'Homme et de *Drosophila* (ainsi que les oiseaux et papillons femelles) sont hétérogamétiques. Les chromosomes non sexuels (appelons-les chromosomes «ordinaires») sont appelés

Tableau 3-1. Déterminaison chromosomique du sexe chez Drosophila et Homo sapiens

	Chromosomes sexuels			
Espèce	XX	XY	XXY	XO
Drosophila	♀	♂	♀	♂
Homo sapiens	♀	♂	♂	♀



(b)

Figure 3-18. Deux espèces de plantes dioïques. (a) *Osmaronia dioica.* (b) *Aruncus dioicus.* Fleurs femelles à gauche, fleurs mâles à droite. [(a), Leslie Bohm, (b), Anthony Griffiths]

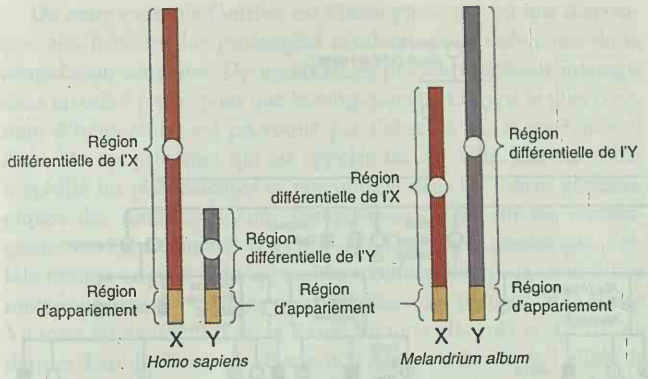


Figure 3-19. Régions différentielle et d'appariement des chromosomes sexuels chez l'être humain et chez la plante *Melandrium album*. Les régions d'appariement ont été localisées par l'analyse cytologique de la formation de la synapsis à la méiose.

autosomes. Les humains ont 46 chromosomes par cellule : 44 autosomes plus deux chromosomes sexuels. La plante *Melandrium album* a 22 chromosomes par cellule : 20 autosomes plus deux chromosomes sexuels.

Les gènes des autosomes présentent un schéma héréditaire du type de celui découvert et étudié par Mendel. Les gènes des différentes régions des chromosomes sexuels présentent des schémas héréditaires qui leur sont propres, comme nous allons le voir.

Hérédité liée à l'X

Nous avons déjà rencontré un exemple d'hérédité liée à l'X chez *Drosophila* : le schéma de transmission de l'oeil blanc et de son allèle sauvage, l'oeil rouge. La couleur de l'oeil n'est naturellement pas impliquée dans la détermination du sexe ; tous les gènes des chromosomes sexuels ne concernent donc pas les fonctions sexuelles. C'est aussi le cas chez l'Homme, où l'analyse d'arbres généalogiques a mis en évidence de nombreux gènes liés à l'X parmi lesquels très peu semblent impliqués dans des fonctions sexuelles. Tout comme nous avions établi précédemment une liste des règles permettant de déceler les cas d'hérédité autosomique chez l'Homme, nous pouvons le faire pour les indices permettant de déceler les gènes liés au chromosome X dans les généalogies humaines.

Les gènes récessifs présentant une liaison à l'X peuvent être décelés dans les pedigrees humains grâce aux indices suivants.

1. Typiquement, beaucoup plus d'hommes que de femmes présentent le phénotype récessif. Ceci provient de ce qu'une femme affectée du phénotype ne peut être engendrée que lorsque la mère et le père sont tous deux porteurs de l'allèle récessif (par exemple, $X^AX^a \times X^aY$), tandis qu'un homme affecté peut être produit si la mère seule est porteuse. Si l'allèle récessif est très rare, presque tous les cas observés le seront chez des hommes.

Les deux indices suivants se rapportent à des phénotypes récessifs liés à l'X qui sont rares dans les populations humaines. Rappelons-nous la discussion, dans le chapitre 2, de l'hérédité mendélienne simple de certains phénotypes humains. Dans la terminologie du présent chapitre, ce type d'hérédité est appelé **hérédité autosomique** parce que les gènes concernés se trouvent tous sur des autosomes. Rappelons-nous aussi que beaucoup de ces phénotypes sont des maladies rares, ce qui nous a permis de faire certaines hypothèses préalables quant à l'incidence de génotypes spécifiques dans une population. Par exemple, dans le cas de phénotypes autosomiques récessifs, on suppose que les personnes qui entrent dans une famille atteinte n'amènent pas elles-mêmes l'allèle en question. Cette supposition qui s'applique particulièrement aux femmes s'unissant à une famille affectée, est implicite dans les deux indices généalogiques suivants.

2. Dans le cas d'un phénotype rare, aucun des enfants d'un homme affecté ne sera lui-même affecté, mais la moitié de ses filles portera le gène en situation cryptique hétérozygote, de sorte que la moitié de leurs fils seront affectés (figure 3-20).(Si le phénotype est courant, cet indice ainsi que le suivant peuvent être masqués par la présence de l'allèle récessif provenant de la mère.)

3. Dans le cas d'un phénotype rare, aucun des fils d'un homme affecté n'héritera du gène, ce qui fait que non seulement ils ne présenteront pas le phénotype, mais encore ils ne transmettront pas le gène à leur descendance. L'absence de transmission de mâle à mâle provient de ce que les fils héritent du chromosome Y de leur père et non de l'X.

Examinons quelques exemples bien établis d'affections récessives rares liées à l'X chez l'Homme. La plus familière est sans doute le daltonisme. Les personnes qui en sont atteintes sont incapables de distinguer le rouge du vert. On dispose à présent de pas mal d'informations sur la base moléculaire de la perception des couleurs. Trois types différents de cellules coniques rétiniennes sont sensibles respectivement au rouge, au vert et au bleu. Les déterminants génétiques des cônes rétiniens sensibles au rouge et au vert se trouvent sur le chromosome X. Comme dans tous les cas d'anomalies récessives liées à l'X, il y a beaucoup plus d'hommes que de femmes qui présentent ce phénotype.

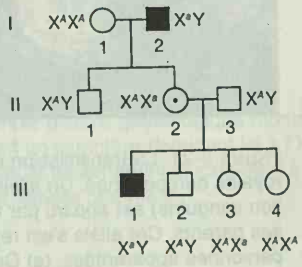
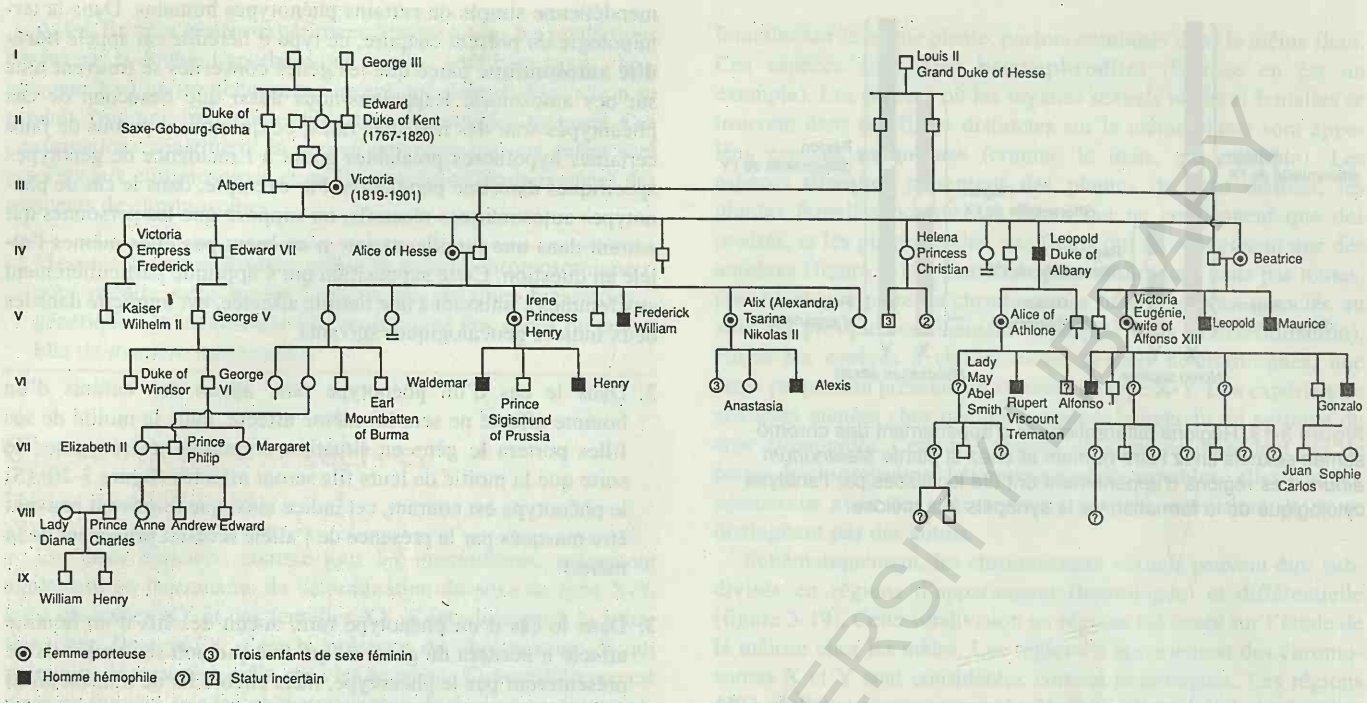
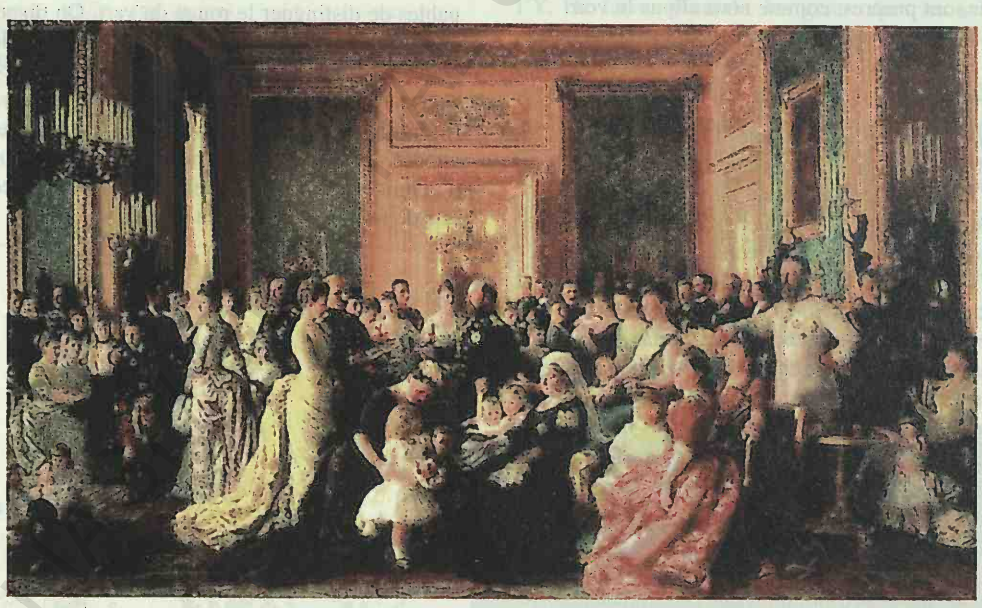


Figure 3-20. Arbre généalogique montrant que les allèles récessifs liés à l'X sont exprimés dans les mâles et portés sans être exprimés par les femelles qui les transmettent à la génération suivante où ils sont exprimés chez leurs fils. Remarquez que les femelles III.3 et III.4 ne peuvent être distinguées sur la base de leur phénotype.





(b)

Figure 3-21. La transmission de l'hémophilie, une condition récessive liée à l'X, chez les familles royales européennes. Un allèle récesssif responsable de l'hémophilie (une déficience de la coagulation sanguine) est apparu par mutation dans les cellules reproductrices de la Reine Victoria ou d'un de ses parents. Cet allèle s'est répandu dans d'autres familles royales à la suite de mariages entre des personnes apparentées. (a) Cette partie d'arbre généalogique montre les hommes affectés et les femmes porteuses (hétérozygotes). La plupart des étrangers entrés dans la famille par mariage ont été omis par souci de simplification. Pouvez - vous déduire de cet arbre la probabilité que des membres de la famille royale britannique actuelle soient porteurs de l'allèle récessif? (b) Le tableau représente la Reine Victoria entourée de sa nombreuse descendance. (a, adapté de C. Stern, *Principles of Human Genetics*, 3rd ed. Copyright 1973 W.H. Freeman. b, Collection royale, Palais de Saint James, Copyright Sa Majesté la Reine Elisabeth II.)

BCU UNIVERSITY LIBRARY

Un autre exemple familier est l'hémophilie qui est une disposition aux hémorragies prolongées résultant d'une déficience de la coagulation sanguine. De nombreuses protéines doivent interagir dans un ordre précis pour que le sang coagule. Le type le plus commun d'hémophilie est provoqué par l'absence ou la dysfonction d'une de ces protéines qui est appelée facteur VIII. Les cas d'hémophilie les plus célèbres se rencontrent dans les arbres généalogiques des familles royales européennes où les unions consanguines ont été fréquentes (figure 3-21). Dans cette généalogie, l'allèle mutant originel a dû apparaître spontanément (à la suite d'une mutation) dans les cellules reproductrices des parents de la Reine Victoria ou dans celles de la Reine Victoria elle-même. Le fils du dernier Tsar de Russie, le Tsarevitch Alexis, a hérité de l'allèle de l'hémophilie porté par la Reine Victoria qui était sa bisaïeule. De nos jours, l'hémophilie peut être traitée médicalement, mais jusqu'il y a peu, il s'agissait d'une condition potentiellement fatale. Il est intéressant de relever que le Talmud contient des règles permettant d'exempter certains enfants de sexe masculin de la circoncision, qui montrent que depuis des temps très anciens, les Juifs avaient compris le mécanisme de transmission de l'hémophilie par des femmes porteuses non atteintes. Un cas d'exemption concernait les fils de femmes dont les soeurs avaient des fils qui avaient saigné abondamment à la circoncision.

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie récessive fatale liée à l'X. Le phénotype est une atrophie dégénérative des muscles qui se déclenche généralement vers l'âge de six ans, provoque l'infirmité motrice vers douze ans (nécessitant l'utilisation d'une chaise roulante) et finalement la mort vers l'âge de vingt ans. Le gène dont la mutation est responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne a été isolé récemment, ce qui permet d'espérer de mieux comprendre la physiologie de cette affection héréditaire.

Un autre phénotype récessif très rare lié à l'X, qui éclaire de façon très intéressante les mécanismes de détermination du sexe est le syndrome de la féminisation testiculaire. Il se présente chez un enfant mâle sur 65000. Les personnes affectées sont génétiquement des mâles puisqu'elles ont 44 autosomes plus un chromosome X et un Y, mais elles se développent comme des femmes (figure 3-22). Elles ont des organes génitaux externes féminins, un vagin, mais pas d'utérus. Des testicules peuvent être présents dans les lèvres vulvaires ou dans l'abdomen. Bien que plusieurs de ces personnes soient mariées et aient des rapports sexuels, elles sont bien entendu stériles. Ce syndrome n'est pas supprimé par un traitement aux hormones mâles, de sorte qu'il est parfois appelé syndrome d'insensibilité aux androgènes. La cause de cette insensibilité est une dysfonction du récepteur des androgènes qui empêche le développement des organes mâles. Chez l'Homme, la féminité est la conséquence du non fonctionnement du système qui détermine la masculinité.

Les gènes dominants présentant une hérédité liée à l'X peuvent être décelés dans les généalogies humaines grâce aux indices suivants.

1. Les hommes affectés transmettent leur état à toutes leurs filles mais à aucun de leurs fils (figure 3-23).

2. Les femmes mariées à un homme non affecté transmettent leur état à la moitié de leurs fils et de leurs filles (figure 3-24)

Les états dominants liés à l'X sont relativement rares. Un exemple en est l'hypophosphatémie (rachitisme résistant à la vitamine D).

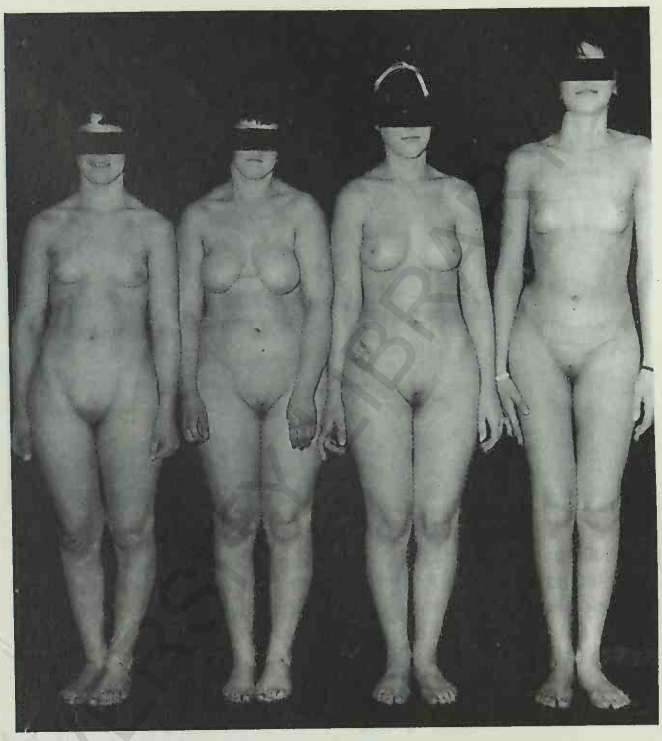


Figure 3-22. Quatre enfants (génétiquement, des frères) présentant le syndrome de féminisation testiculaire (insensibilité congénitale aux androgènes). Les quatre individus sur la photo ont 44 autosomes plus un X et un Y, mais ils ont hérité de l'allèle récessif lié à l'X conférant l'insensibilité aux hormones mâles. Une de leurs soeurs (qui n'est pas montrée ici) était une porteuse qui a eu un enfant présentant aussi le syndrome. (Léonard Pinsky, Université McGill)

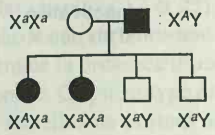


Figure 3-23. Exemple de pedigree montrant comment les gènes dominants liés à l'X sont exprimés chez toutes les filles des mâles affectés du caractère corespondant.

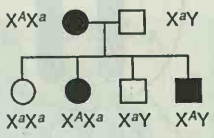


Figure 3-24. Exemple d'arbre généalogique montrant que les femelles présentant un caractère dominant lié à l'X sont généralement hétérozygotes et transmettent le caractère à une moitié de leur descendance, tant femelle que mâle.

Inactivation du chromosome X

Très tôt dans le développement des mammifères femelles, un des chromosomes X de chaque cellule est inactivé. Le chromosome X inactivé est très condensé et prend l'aspect d'un corpuscule

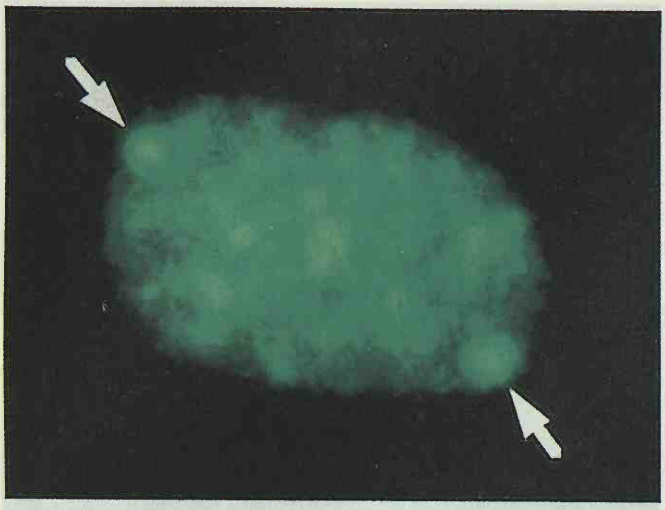


Figure 3-25. Des corpuscules de Barr. Il s'agit de chromosomes X inactivés par condensation extrême (hétérochromatisation), présents dans les noyaux d'une femme normale. Les hommes n'ont pas de corpuscules de Barr. Le nombre de corpuscules de Barr dans une cellule est toujours égal au nombre de chromosomes X moins un. (Karen Dyer Montgomery)

qui se colore de façon intense et que l'on appelle **corpuscule de Barr** (figure 3-25). Cette inactivation continue de se produire après chacune des divisions mitotiques qui produisent l'animal adulte. Le processus d'inactivation est aléatoire, affectant tantôt l'un tantôt l'autre des chromosomes X. Il s'ensuit que le corps des femelles adultes est un mélange ou une **mosaïque** de cellules dont le génotype diffère selon l'X qui a été inactivé (figure 3-26). Pendant la croissance de certains tissus, la descendance mitotique d'une cellule progénitrice reste groupée, de sorte que si une femelle est hétérozygote pour un gène lié à l'X dont la fonction s'exprime dans le tissu en question, les deux allèles de l'hétérozygote seront exprimés par taches ou par secteurs. Un phénotype en mosaïque qui nous est familier est celui de la fourrure des chats écaille de tortue et calico (figure 3-27).Ces chats sont des femelles hétérozygotes pour les allèles *O* (qui détermine la couleur orange de la fourrure) et *o* (qui détermine la couleur noire). L'inactivation du chromosome X porteur de *O* produit un secteur noir dans lequel *o* est exprimé et l'inactivation du X porteur de *o* produit un secteur orange correspondant à des cellules qui expriment *O*.

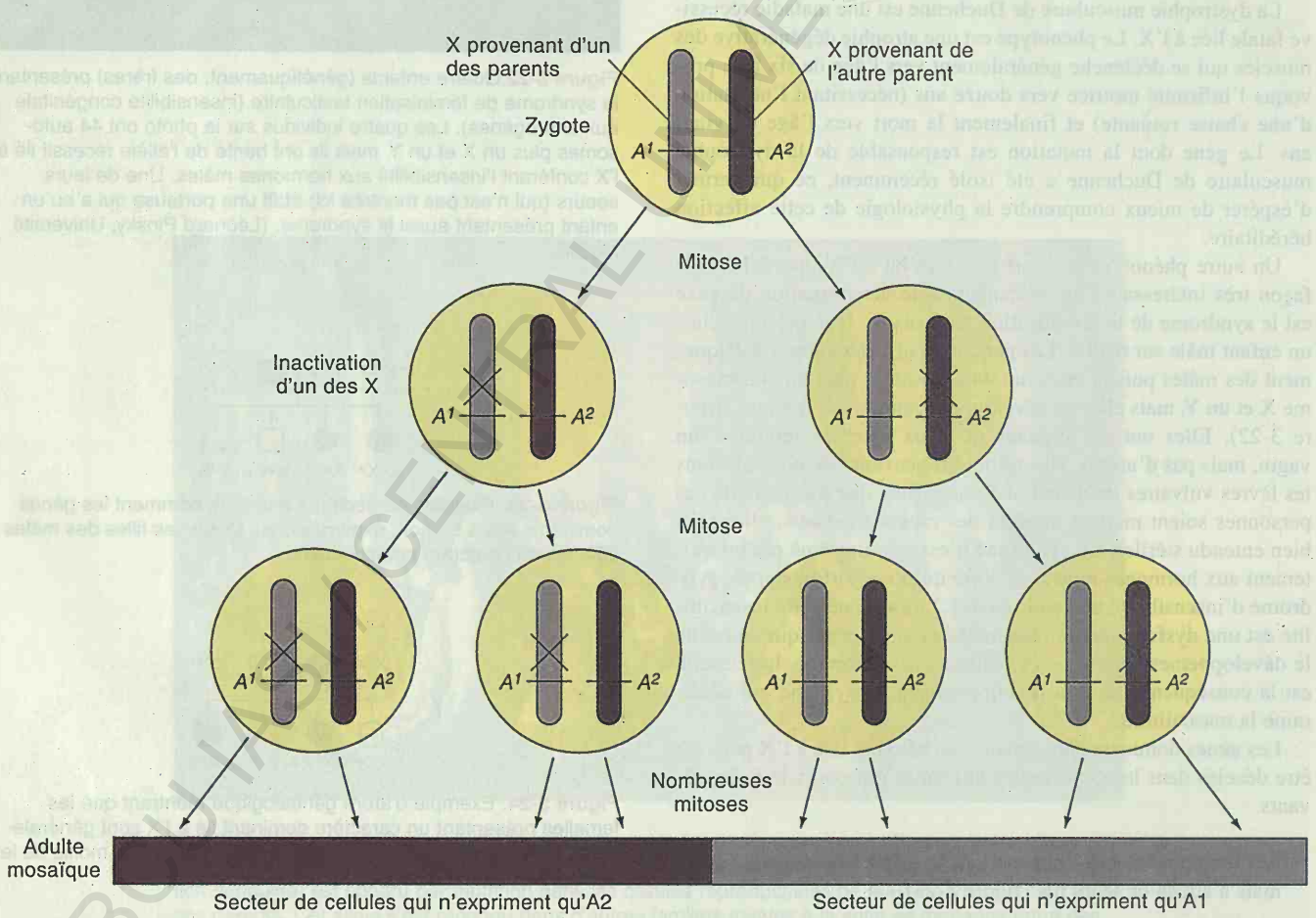


Figure 3-26. Inactivation du chromosome X chez les mammifères. Le zygote d'un mammifère femelle hétérozygote pour un gène lié à l'X devient un adulte qui est une mosaïque génétique, composée de deux lignées cellulaires exprimant l'un ou l'autre des des allèles du gène hétérozygote selon le chromosome X qui a été inactivé. Par souci de simplification, l'inactivation est présentée comme si elle avait lieu au stade deux cellules, mais elle peut aussi se produire à d'autres stades à petit nombre de cellules de l'embryogénèse.

Figure 3-27. Un chat «calico». Les chats «calico» et «écaille de tortue» sont des femelles hétérozygotes pour une paire d'allèles d'un gène lié à l'X qui détermine la couleur du pelage. *O* (orange) et *o* (noir). Les secteurs oranges et noirs sont la conséquence de l'inactivation de l'un des X. Les zones blanches sont dues à l'expression d'un autre déterminant génétique qui est présent chez les chats calico, mais pas chez les chats écaille de tortue.

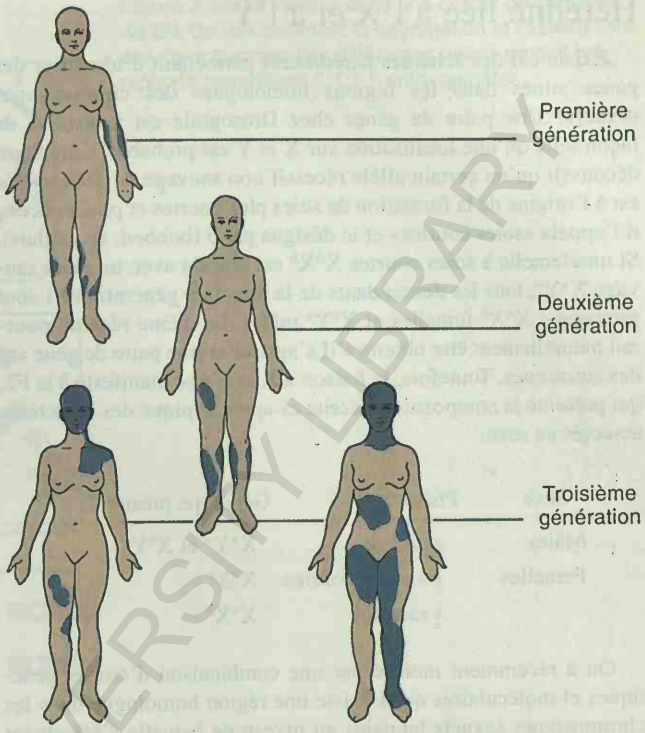


Figure 3-28. Mosaïcisme somatique chez trois générations de femmes hétérozygotes pour le gène lié à l'X dont un allèle est responsable de la dysplasie anhidrotique de l'ectoderme. Cette dysfonction des glandes sudoripares peut être mise en évidence au moyen d'un colorant inoffensif (elle apparaît sous forme de taches bleues sur la figure). La localisation et l'extension du symptôme dans les différents tissus sont l'effet du hasard, mais chaque femme présente l'aspect en mosaïque caractéristique.

Bien que toutes les cellules des femmes aient un X inactivé, cela n'est décelable que quand elles sont hétérozygotes pour un gène lié à l'X. Cela se remarque particulièrement quand, comme chez les chats écaille de tortue, le phénotype s'exprime au niveau de l'apparence extérieure du corps. Un exemple d'affection liée à l'X qui donne lieu à un mosaïcisme somatique est la dysplasie anhidrotique de l'ectoderme (anhidrose). Les hommes porteurs de l'allèle incriminé (appelons-le *d*) en situation hémizygotique n'ont pas de glandes sudoripares. Le corps d'une femme hétérozygote (*Dd*) est une mosaïque de secteurs *D* et *d* (figure 3-28). Il est intéressant de mentionner que la localisation du gène responsable de la féminisation testiculaire sur le chromosome X a été confirmée par la démonstration que chez les femmes hétérozygotes pour ce gène, une moitié des fibroblastes fixe les androgènes et l'autre moitié ne les fixe pas.

Hérédité liée à l'Y

Chez les humains, les gènes situés dans la région différentielle du chromosome Y devraient être transmis uniquement aux mâles, de père en fils. Toutefois, à part le caractère mâle lui-même, aucun cas d'une telle hérédité n'a été définitivement établi, bien que la pilosité du bord du lobe de l'oreille ait été suggérée comme un cas possible (figure 3-29). Ce phénotype est extrêmement rare parmi les populations de la plupart des contrées, mais un peu plus commun en Inde. Un généticien indien, K. Dronamraju, a étudié la transmission de ce trait dans sa propre famille. Tous les hommes de sa famille qui descendent d'un ancêtre mâle particulier présentent ce trait. Toutefois, dans d'autres familles indiennes, les mâles semblent ne transmettre le trait qu'à certains de leurs fils, ce qui est une des raisons pour lesquelles les preuves de la liaison à l'Y de ce caractère ne sont pas considérées comme concluantes.

Bien sûr, la virilité est elle-même liée à l'Y. Un gène qui joue un rôle prépondérant dans l'établissement du caractère mâle est le gène TDF qui code pour un **facteur déterminant des testicules**. le gène TDF a été cartographié dans la région différentielle du chromosome Y (voir les chapitres 17 et 23).

Chez le poisson *Lebistes*, le chromosome Y porte un gène appelé *maculatus* qui détermine la présence d'une tache pigmentée à la base de la nageoire dorsale. Ce phénotype est transmis uniquement de père en fils, et les femelles ne portent ni n'expriment le gène, ce qui constitue un exemple très clair de liaison à l'Y.

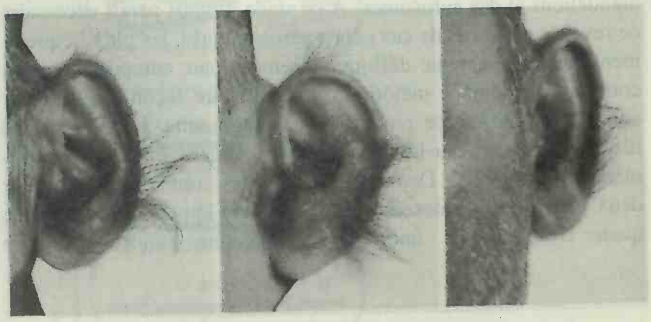


Figure 3-29. La pilosité du bord du lobe de l'oreille pourrait être causée par un allèle d'un gène lié à l'Y. (Extrait de C. Stern, W.R. Centerwall et S.S. Sarkar, *The American Journal of Human Genetics* 16, 467, 1964. Avec l'autorisation de Grune et Stratton, Inc.)

Hérédité liée à l'X et à l'Y

Existe-t-il des schémas héréditaires permettant d'identifier des gènes situés dans les régions homologues des chromosomes sexuels? Une paire de gènes chez Drosophila est transmise de façon telle qu'une localisation sur X et Y est probable. Curt Stern découvrit qu'un certain allèle récessif non sauvage de *Drosophila* est à l'origine de la formation de soies plus courtes et plus minces ; il l'appela «soies courtes» et le désigna par *b* (bobbed, en anglais). Si une femelle à soies courtes X^bX^b est croisée avec un mâle sauvage X^+Y^+, tous les descendants de la première génération F1 sont sauvages : X^+X^b femelles et X^bY^+ mâles. Le même résultat pourrait naturellement être obtenu s'il s'agissait d'une paire de gène sur des autosomes. Toutefois, la liaison à X et à Y se manifeste à la F2, qui présente la composition décrite ci-après, typique des caractères associés au sexe.

Sexe	Phénotype	Génotype présumé
Mâles	sauvage	X^+Y^+ et X^bY^+
Femelles	$\frac{1}{2}$ à soies courtes	X^bX^b
	$\frac{1}{2}$ sauvage	X^+X^b

On a récemment montré par une combinaison d'études génétiques et moléculaires qu'il existe une région homologue dans les chromosomes sexuels humains au niveau de laquelle s'effectuent appariement et crossing-over. En fait, il est connu qu'un crossing-over se produit obligatoirement dans cette région à chaque méiose, de sorte que les allèles compris dans cette zone sont en réalité découplés des régions uniques des chromosomes X et Y et présentent une hérédité dite **pseudoautosomique.**

Message Les profils héréditaires qui présentent une répartition inégale des phénotypes entre les mâles et les femelles permettent de localiser les gènes correspondants sur l'un des chromosomes sexuels ou sur les deux.

Le comportement parallèle des gènes autosomiques et des chromosomes

Les modes d'hérédité résultant du comportement normal et de la non-disjonction des chromosomes sexuels confirment de façon satisfaisante la théorie chromosomique de l'hérédité, laquelle fut suggérée originellement par le comportement parallèle des gènes mendéliens et des autosomes. A ce stade, il nous paraît nécessaire de revenir sur le cas de ces gènes autosomiques, les plus fréquemment rencontrés, pour définir clairement leur comportement au cours du phénomène méiotique. La meilleure façon de présenter cela en résumé est de recourir à un diagramme. La figure 3-30 illustre le passage par la méiose d'une cellule hypothétique extrêmement simplifiée . Deux paires de gènes sont représentées sur deux paires de chromosomes. Notre cellule hypothétique possède quatre chromosomes : une paire d'homologues longs et une paire d'homologues courts. (De telles différences de taille entre paires sont courantes.) Le génotype de la cellule est défini arbitrairement comme étant *Aa Bb*.

Comme le montre le diagramme, deux modes également fréquents d'attachement au fuseau (4 et 4') sont à l'origine de deux schémas de base pour la ségrégation des paires de gènes. La méiose produit alors quatre cellules dont les génotypes sont fixés par ces schémas de ségrégation. Comme les schémas 4 et 4' sont également fréquents, les cellules de génotypes *AB, ab, Ab*, et *aB* sont produites par la méiose avec la même fréquence. En d'autres termes, chacun des génotypes apparaît avec un fréquence d'1/4. Ceci est, évidemment, la distribution postulée dans le modèle de Mendel et celle que nous avons alignée le long des côtés de la grille de Punnett classique, représentée dans la figure 2-10. Nous sommes à présent en mesure de comprendre le mécanisme chromosomique précis qui produit les rapports mendéliens.

Remarquez bien que la première loi de Mendel (ségrégation égale) est un résultat direct de la séparation d'une paire d'homologues (portant la paire de gènes étudiée) dans des cellules filles à la première division. Observez également que la deuxième loi de Mendel (assortiment indépendant) découle du comportement indépendant des différentes paires de chromosomes homologues.

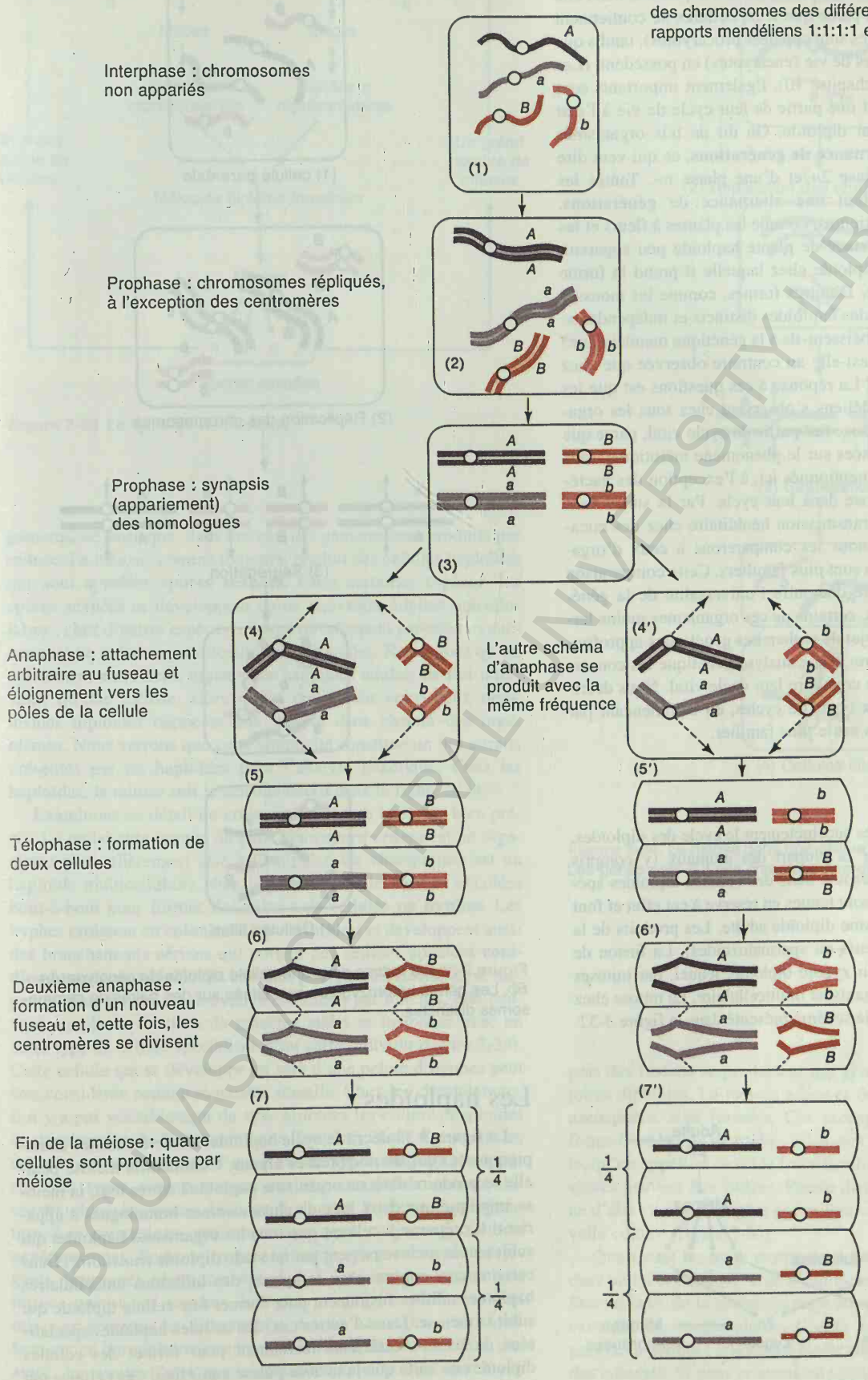
La théorie chromosomique est importante à bien des égards. A ce stade de notre discussion, insistons sur l'importance qu'elle a en focalisant l'attention sur le rôle du génotype de la cellule dans la détermination du phénotype de l'organisme. Le phénotype d'un organisme est déterminé par les phénotypes de toutes ses cellules individuelles. Le phénotype cellulaire, à son tour, est déterminé par les allèles présents sur les chromosomes de la cellule. Quand nous disons qu'un organisme est (par exemple) *AA*, nous voulons en réalité dire que chaque cellule de cet organisme est *AA*. Ce génotype cellulaire détermine comment la cellule fonctionne, contrôlant de la sorte son phénotype et au-delà, le phénotype de l'organisme.

Message Le phénotype d'un organisme est déterminé par l'action des gènes au niveau cellulaire

Génétique mendelienne et cycles vitaux

Jusqu'ici, notre discussion a porté essentiellement sur des organismes diploïdes - des organismes qui ont deux jeux homologues de chromosomes par cellule. Comme nous l'avons vu, «diploïde» est indiqué par $2n$, n signifiant un jeu de chromosomes (par exemple, la cellule de pois contient deux jeux de sept chromosomes, soit $2n = 14$). La plupart des organismes que nous rencontrons dans notre existence quotidienne sont de façon prédominante diploïdes ; il s'agit des plantes dites supérieures (y compris les plantes à fleurs) et des animaux (y compris l'Homme). Néanmoins, une large part (probablement la majeure partie) de la biomasse est constituée d'organismes qui passent la majeure partie de leur vie à l'état haploïde, dans lequel chaque cellule n'a qu'un jeu de chromosomes. Particulièrement importants ici sont les champignons et

Figure 3-30. La méiose dans une cellule de génotype *Aa Bb*. On voit comment la ségrégation et l'assortiment des chromosomes des différentes paires produit les rapports mendéliens 1:1:1:1 entre gamètes.



BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

les algues, dont la majorité est, de façon prédominante, haploïde. Les bactéries peuvent être considérées comme haploïdes, mais elle constituent un cas spécial parce que leurs cellules ne contiennent pas de véritable noyau (elles sont appelées procaryotes), tandis que la plupart des autres formes de vie (eucaryotes) en possèdent. (Les bactéries font l'objet du chapitre 10). Egalement importants sont les organismes qui passent une partie de leur cycle de vie à l'état haploïde et l'autre à l'état diploïde. On dit de tels organismes qu'ils présentent une **alternance de générations,** ce qui veut dire une «alternance d'une phase 2*n* et d'une phase n». Toutes les plantes, en fait, présentent une alternance de générations. Toutefois, les formes supérieures, comme les plantes à fleurs et les conifères, passent par un stade de plante haploïde peu apparent, qui dépend de la plante diploïde chez laquelle il prend la forme d'une structure spécialisée. D'autres formes, comme les mousses et les fougères, ont des stades haploïdes distincts et indépendants.

Ces cycles cellulaires obéissent-ils à la génétique mendélienne? L'hérédité mendélienne n'est-elle au contraire observée que chez les organismes supérieurs? La réponse à ces questions est que les schémas héréditaires mendéliens s'observent chez tous les organismes chez lesquels la méiose fait partie du cycle vital, parce que les lois de Mendel sont basées sur le phénomène méiotique. Tous les groupes d'organismes mentionnés ici, à l'exception des bactéries, ont recours à la méiose dans leur cycle. Par la suite, nous aborderons les modes de transmission héréditaire chez des eucaryotes moins courants et nous les comparerons à ceux d'organismes dont les cycles nous sont plus familiers. Cette comparaison est importante parce qu'elle démontre l'universalité de la génétique mendélienne. De plus, certains de ces organismes moins largement connus ont fait l'objet de recherches génétiques approfondies, et pour pouvoir se livrer à une analyse génétique les concernant, il est indispensable de connaître leur cycle vital. Nous décrirons ici les trois principaux types de cycles, en commençant par celui des diploïdes qui nous est le plus familier.

Les diploïdes

La figure 3-31 résume très succinctement le cycle des diploïdes. Il s'agit du cycle suivi par la plupart des animaux (y compris l'Homme). La méiose s'y déroule dans des cellules diploïdes spécialisées, les méiocytes, qui sont tenues en réserve à cet effet et font partie intégrante de l'organisme diploïde adulte. Les produits de la méiose sont les gamètes (oeufs ou spermatozoïdes). La fusion de gamètes haploïdes produit un zygote diploïde, lequel, par mitoses successives, aboutira à un organisme multicellulaire. La mitose chez un diploïde se déroule selon le schéma présenté dans la figure 3-32.

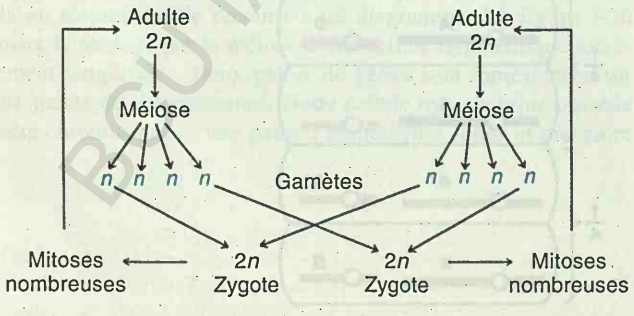


Figure 3-31. Le cycle de vie diploïde.

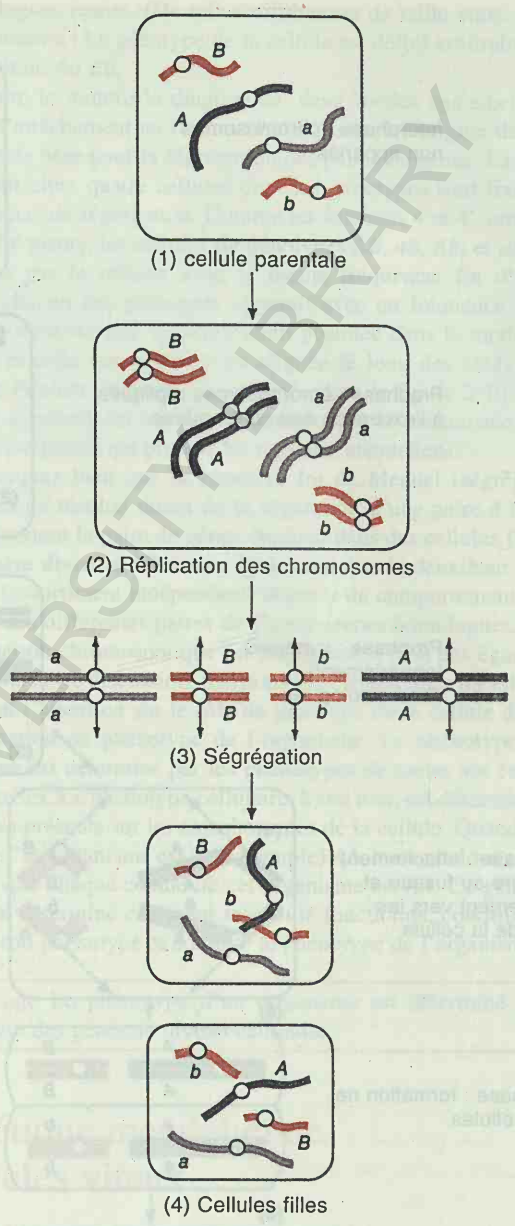


Figure 3-32. La mitose dans une cellule diploïde de génotype *Aa Bb*. Les gènes hétérozygotes sont situés sur des paires de chromosomes distinctes.

Les haploïdes

La figure 3-33 décrit le cycle haploïde, observé chez les champignons et chez de nombreuses algues. Comment la méiose peut-elle se produire dans un organisme haploïde? Après tout, la méiose implique que deux jeux de chromosomes homologues s'apparient! La réponse à celà est que tous les organismes haploïdes qui subissent la méiose passent par un stade diploïde *transitoire*. Dans certains cas, comme chez la levure, des individus unicellulaires haploïdes adultes fusionnent pour former une cellule diploïde qui subit la méiose. Dans d'autres cas, des cellules haploïdes spécialisées de parents différents fusionnent pour former des cellules diploïdes de sorte que la méiose puisse avoir lieu. Ces cellules qui fusionnent sont appelées, de façon tout-à-fait appropriée des

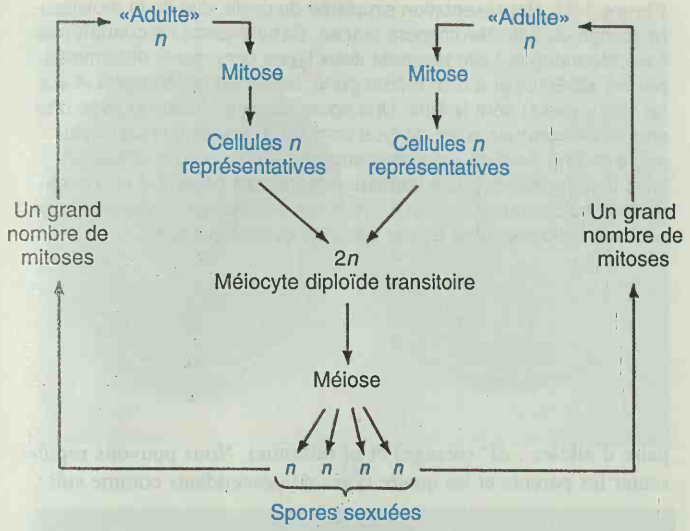


Figure 3-33. Le cycle de vie haploïde.

gamètes, de sorte que, dans ces cas, des gamètes sont produits par mitose. La méiose, comme toujours, produit des cellules haploïdes qui sont appelées **spores sexuées.** Chez certaines espèces, les spores sexuées se développent en de nouveaux adultes unicellulaires ; chez d'autres espèces, elles se développent par mitoses successives en individus multicellulaires haploïdes. Remarquez qu'un croisement entre deux organismes haploïdes adultes ne fait intervenir qu'une méiose, alors qu'un croisement entre deux organismes diploïdes nécessite une méiose dans chacun des organismes. Nous verrons que cette simplicité constitue un des attraits présentés par les haploïdes pour l'analyse génétique. Chez les haploïdes, la mitose suit le schéma décrit dans la figure 3-34.

Examinons en détail un croisement chez un haploïde bien précis. La moisissure orange du pain *Neurospora crassa* est un organisme particulièrement aisé à manipuler. Ce champignon est un haploïde multicellulaire chez lequel les cellules restent accolées bout-à-bout pour former des rubans de cellules ou **hyphes.** Les hyphes croissent en colonisant tout le substrat et développent aussi des branchements aériens qui portent des cellules appelées **conidies (spores asexuées).** Les conidies peuvent se détacher et se disperser pour former de nouvelles colonies ; par ailleurs, elle peuvent remplir la fonction de gamètes mâles et fusionner avec un autre type de cellule spécialisée d'un autre individu (figure 3-35). Cette cellule qui se développe au sein d'une pelote d'hyphes peut être considérée comme le gamète femelle. Chez les champignons, il n'y a pas véritablement de sexe et toutes les cultures haploïdes se développent de façon identique. Toutefois, pour fusionner, les cellules doivent provenir d'individus de **types conjugants** opposés. Les types conjugants peuvent être considérés comme des «sexes physiologiques», bien qu'il s'agisse là d'une approximation. Les populations contiennent des types conjugants distincts génétiquement. *Neurospora* possède deux types ou signes conjugants déterminés génétiquement, *A* et *a*. Des croisements ne sont fertiles que si des souches de signes conjugants différents sont mises en présence (en l'occurence, $A \times a$). Les croisements s'effectuent en introduisant les spores asexuées d'une culture dans une autre. Le noyau d'une spore asexuée s'apparie avec un noyau femelle. Cette paire subit des divisions mitotiques synchrones,

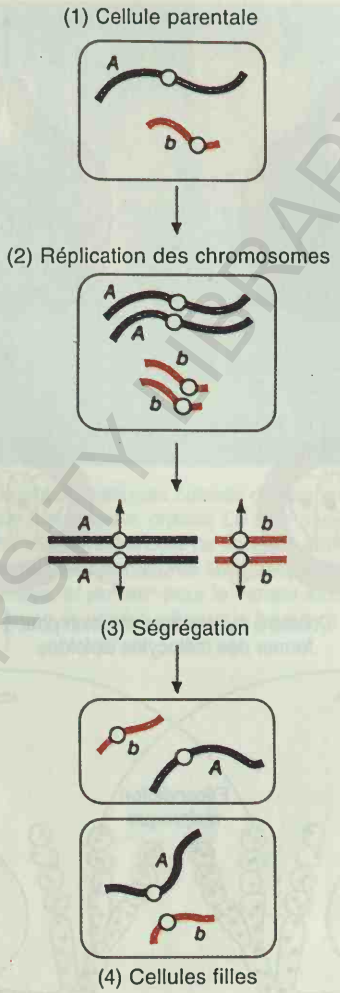


Figure 3-34. La mitose dans une cellule haploïde de génotype *A b*. Les gènes sont sur des chromosomes distincts.

puis des fusions se produisent qui génèrent des méiocytes transitoires diploïdes. La méiose a lieu et des spores sexuées, appelées **ascospores**, sont formées. Ces ascospores sont noires et ont la forme d'un ballon de rugby ; elles sont éjectées de la pelote hyphale, qu'on appelle à ce stade fructification ou conceptacle. Les ascospores peuvent être isolées. Placée dans un tube de culture, chacune d'elle va se développer par mitose et être à l'origine d'une nouvelle culture (figure 3-36).

Quels sont les traits morphologiques qui se prêtent à l'analyse chez un tel organisme? L'un d'entre-eux est la couleur des cellules. Des variants de la couleur orange normale peuvent être isolés, par exemple une souche albinos (figure 3-38). Un autre trait est l'aspect de la culture : croissance étalée (normal) ou tendance à former des colonies. Si nous croisons une culture orange à croissance étalée avec une culture albinos formant des colonies, et que nous iso-

UNIVERSITY LIBRARY

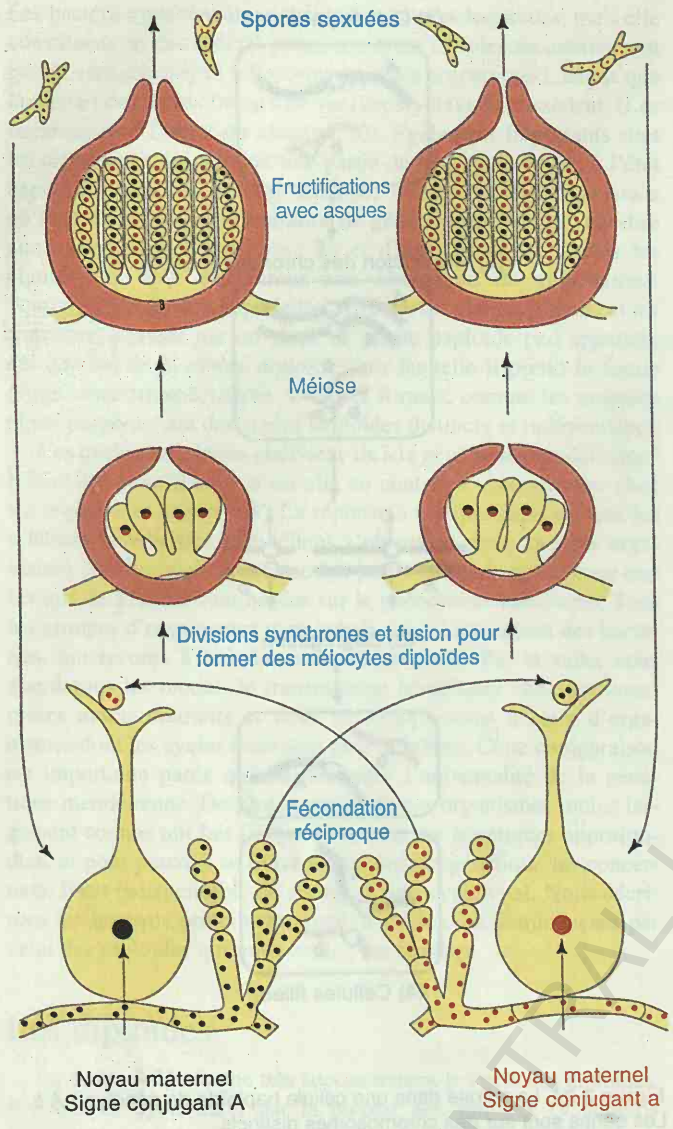


Figure 3-35. Représentation simplifiée du cycle vital de la moisissure orange du pain Neurospora crassa. Cette espèce ne connaît pas l'autofécondation : elle présente deux types conjugants déterminés par les allèles *A* et *a* d'un même gène. Seuls les croisements *A* x *a* (et vice - versa) sont fertiles. Une spore asexuée fusionne avec une structure réceptrice ciliée de type conjugant opposé, et un noyau migre le long de celle - ci pour s'apparier au noyau d'une des cellules de la pelote hyphale correspondante. Les noyaux *A* et *a* s'apparient, subissent un certain nombre de mitoses synchrones et finissent par fusionner pour former des méiocytes diploïdes.

lons et mettons en culture 100 ascospores, les cultures obtenues auront (statistiquement) les phénotypes suivants :

25 % de cultures oranges étalées
25 % de cultures albinos formant des colonies
25 % de cultures albinos étalées
25 cultures oranges formant des colonies

Au total, une moitié de la descendance présente un croissance étalée et une moitié à tendance a former des colonies. Donc, ces phénotypes sont déterminés par une paire d'allèles qui a ségrégé de façon égale à la méiose. Nous pouvons les définir par col^+ (croissance étalée) et *col* (formation de colonies). Il en va de même pour l'autre trait : une moitié est orange et l'autre, albinos, ce qui signifie que la différence de couleur est aussi déterminée par une paire d'allèles : al^+ (orange) et *al* (albinos). Nous pouvons représenter les parents et les quatre types de descendants comme suit :

Parents

$col^+\ al^+$ (étalé, orange) × *col al* (colonies, albinos)

↓

Descendants

$col^+\ al^+$ (étalé, orange)
col al (colonies, albinos)
$col\ ^+al$ (étalé, albinos)
$col\ al^+$(colonies, orange)

Le rapport 1 : 1 : 1 : 1 résulte de l'assortiment indépendant, comme le montre le diagramme suivant :

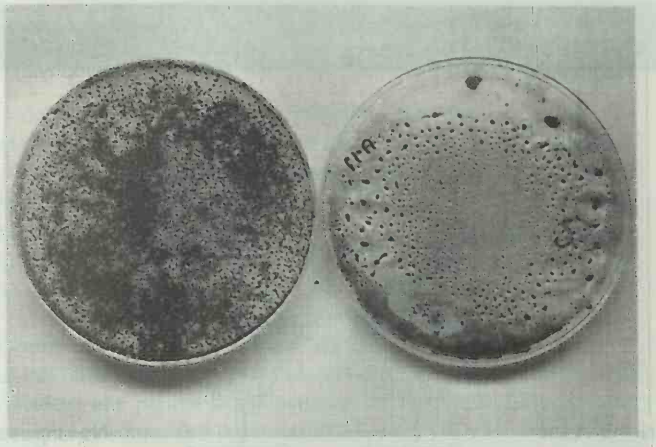
$\frac{1}{2}\ col^+$ → $\frac{1}{2}\ al^+$ → $\frac{1}{4}\ col^+\ al^+$
$\frac{1}{2}\ col^+$ → $\frac{1}{2}\ al$ → $\frac{1}{4}\ col^+\ al$
$\frac{1}{2}\ col$ → $\frac{1}{2}\ al$ → $\frac{1}{4}\ col\ al$
$\frac{1}{2}\ col$ → $\frac{1}{2}\ al^+$ → $\frac{1}{4}\ col\ al^+$

Nous voyons ainsi que même chez un organisme aussi simple, les lois de Mendel sont d'application.

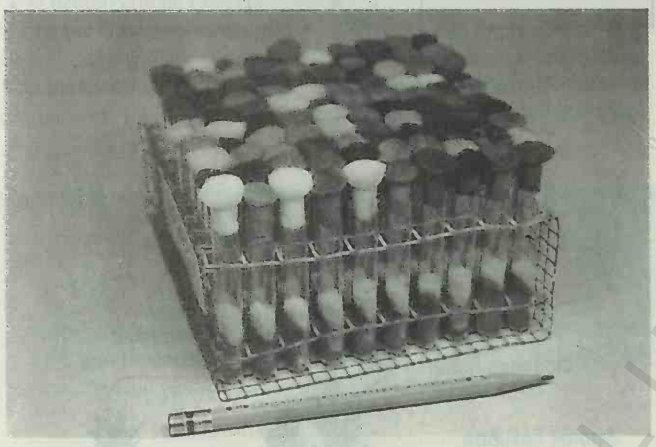
Les organismes alternativement haploïdes et diploïdes

Chez les organismes qui présentent une alternance de générations, le cycle de vie comporte deux stades : haploïde et diploïde. Généralement, un des stades prédomine. Par exemple, ce que nous reconnaissons tous comme une plante de fougère est le stade diploïde, mais cet organisme connaît un stade haploïde indépendant, caractérisé par une petite taille et une activité photosynthétique intense, et qui est difficilement repérable sur le tapis forestier. Chez les mousses, la plante verte correspond au stade haploïde et la tige brunâtre qui en émerge constitue un stade diploïde, dépendant de la plante et la parasitant même.

BOURSI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



(a)



(b)

Figure 3-36. (a) Un croisement de *Neurospora* réalisé sur une boîte de Petri. Les nombreuses petites sphères noires sont les fructifications dans lesquelles s'est produite la méiose; les ascospores (spores sexuées) ont été projetées sous la forme d'une fine poussière dans l'humidité condensée dans le couvercle (qui a été soulevé et déposé à droite de la boîte). (b) Un ravier contenant les tubes de cultures des descendants du croisement. Chaque culture est faite à partir d'une ascospore isolée. (Anthony Griffiths.)

Figure 3-37. Variants génétiques colorés différement du champignon filamenteux *Neurospora crassa*. Le type sauvage de couleur orange (à droite) est montré à côté de variants albinos, jaune et brun. Les génotypes de ces cultures sont respectivement al^+ylo^+ ad^+ pour le sauvage, *al ylo*$^+$ *ad*$^+$ pour le variant albinos, al^+ *ylo ad*$^+$ pour le variant jaune et al^+ *ylo*$^+$ *ad* pour le brun.)

Chez les plantes à fleurs, le stade principal est, bien sûr, diploïde. Les stades haploïdes des plantes à fleurs sont extrêmement brefs et dépendants du diploïde. Ces haploïdes se trouvent dans la fleur. Les produits haploïdes de la méiose, qui se produit dans les méiocytes de l'anthère et de l'ovaire, sont appelés **spores**. Les spores subissent quelques divisions mitotiques, produisant un petit stade haploïde multicellulaire. En cas d'alternance de générations, le stade diploïde est appelé le **sporophyte**, ce qui signifie la plante produisant des spores sexuées. Le stade haploïde est appelé **gamétophyte**, ce qui signifie la plante produisant des gamètes. Le gamétophyte mâle des plantes à graines est le grain de pollen. La figure 3-38 montre que chez les plantes à fleurs, des cellules du gamétophyte fonctionnent comme oeuf ou comme gamète mâle lors de la fertilisation. Le schéma général d'un cyle de vie avec alternance des générations est représenté dans la figure 3-39.

Chez les mousses et les fougères, les gamètes mâles (anthérozoïdes) sont très mobiles et doivent se transporter d'un gamétophyte à un autre dans un film aqueux pour accomplir la fécondation. Voyons un exemple de croisement chez une mousse. Le trait étudié peut bien entendu se rapporter au gamétophyte ou au sporophyte. Considérons une paire de gènes qui affecte les «feuilles» du gamétophyte, l'allèle *w* déterminant des bords ondulés et w^+, des bords lisses. Supposons également qu'une autre paire de gènes influence la couleur du sporophyte, l'allèle *r* déterminant une coloration rougeâtre et r^+, la coloration brune normale. Un gamétophyte à feuilles lisses portant également un allèle *r* non exprimé est fertilisé par l'apport de gamètes mâles provenant d'un gamétophyte à feuilles ondulées, et portant r^+(figure 3-40). Un sporophyte diploïde se développe sur le gamétophyte et il est brun (parce que rougeâtre est récessif). Les spores sexuées produites par ce sporophyte seront

25 % w^+r^+
25 % w^+r^-
25 % w^-r^+
25 % w^-r^-

Bien entendu, seul le trait concernant la feuille sera identifiable dans ces gamétophytes ; la situation r^+ ou r^- devra être établie par des croisements appropriés.

Une fois encore, les lois de Mendel gouvernent l'hérédité. Il suffit de se rappeler le degré de ploïdie (le nombre de jeux de chromosomes) à chaque étape du cycle et tout se résout en de simples rapports mendéliens.

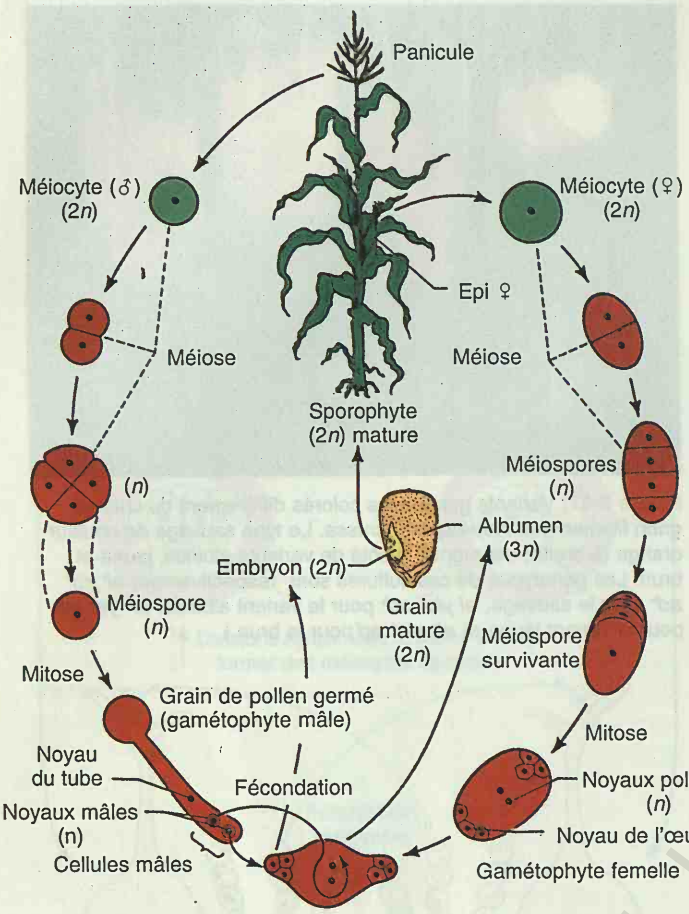


Figure 3-38. Alternance de générations chez le maïs. Le gamétophyte mâle provient d'un méiocyte du panicule. Le gamétophyte femelle est produit à partir d'un méiocyte de l'épi femelle. Une cellule spermatique fusionne avec la cellule terminale du gamétophyte femelle et la cellule diploïde ainsi formée donne naissance à l'embryon. L'autre cellule spermatique fusionne avec deux noyaux femelles centraux pour produire une cellule triploïde (*3n*) qui est à l'origine de l'albumen ou endosperme qui entoure l'embryon. L'endosperme assure la nutrition de l'embryon durant la germination de la graine. Quelle partie du diagramme correspond - elle au stade haploïde? Au stade diploïde?

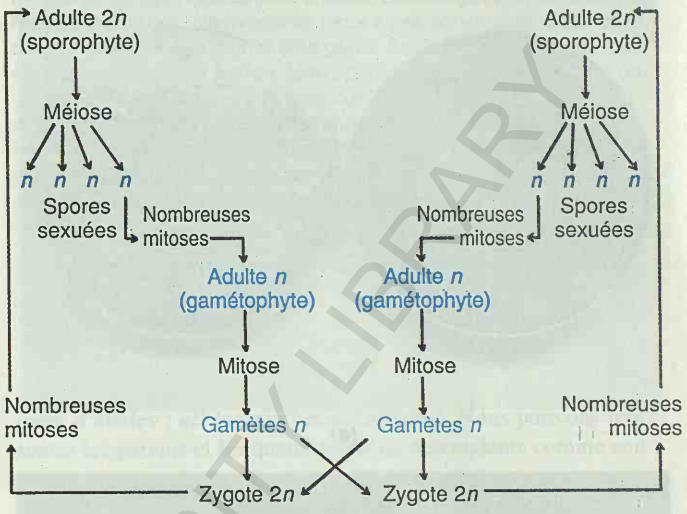


Figure 3-39. L'alternance des stades diploïde et haploïde durant le cycle vital des plantes.

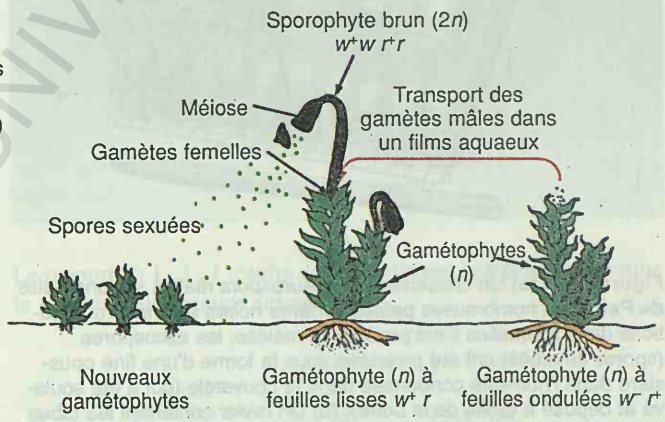


Figure 3-40. Diagramme illustrant l'application de la génétique mendélienne lors d'un croisement hypothétique chez une mousse. L'alternative entre états w^+ ou w^- ne se manifeste qu'au stade du gamétophyte haploïde, tandis que l'alternative entre états r^+ et r^- ne s'observe qu'au stade du sporophyte diploïde.

Message Les lois de Mendel s'appliquent aux produits de la méiose chez n'importe quel organisme. Leur formulation générale est la suivante :

1. A la méiose, les allèles d'un gène ségrègent de façon égale entre les produits haploïdes de la méiose.
2. A la méiose, la ségrégation d'une paire d'allèles est indépendante de la ségrégation des allèles des gènes portés par d'autres paires de chromosomes.

La théorie de la localisation chromosomique des gènes explique parfaitement les schémas héréditaires. La théorie chromosomique de l'hérédité n'est plus mise en doute ; elle constitue une des pierres angulaires de la biologie moderne.

BU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

RÉSUMÉ

Après la redécouverte des principes mendéliens en 1900, les scientifiques se sont donné pour tâche d'identifier les structures cellulaires correspondant aux unités d'hérédité dont Mendel avait postulé l'existence et que nous appelons gènes. Se rendant compte que le comportement des chromosomes à la méiose est parallèle à celui des gènes, Walter Sutton et Theodor Boveri suggérèrent que les gènes sont localisés dans ou sur les chromosomes.

Au cours d'expériences sur une certaine espèce de sauterelle, Elinor Carothers découvrit que les différentes paires de chromosomes s'assortissent de façon indépendante. Cette découverte constitua une preuve supplémentaire de ce que le comportement des chromosomes suit étroitement celui des gènes. D'autres arguments en faveur de la théorie chromosomique de l'hérédité vinrent de la découverte de l'hérédité liée au sexe et de l'existence de chromosomes sexuels. Thomas Hunt Morgan montra que l'hérédité en zigzag de la couleur rouge ou blanche de l'oeil correspond parfaitement au comportement des chromosomes X et Y à la méiose. Finalement, l'hypothèse de la non-disjonction (un défaut de séparation des chromosomes appariés) à la méiose permit à Calvin Bridges de faire des prédictions vérifiables expérimentalement, basées sur la localisation du gène déterminant la couleur de l'oeil sur le chromosome X. La confirmation de ses prédictions apporta la preuve irréfutable de la localisation chromosomique des gènes.

Nous connaissons à présent les mécanismes chromosomiques responsables des rapports mendéliens. La première loi de Mendel (ségrégation égale) est la conséquence de la répartition d'une paire de chromosomes homologues entre les cellules issues de la première division. La seconde loi de Mendel (assortiment indépendant) résulte du comportement indépendant des différentes paires de chromosomes homologues.

Etant donné que les lois de Mendel sont basées sur la méiose, l'hérédité mendélienne se retrouve chez tout organisme dont le cycle vital comporte une étape méiotique. Parmi les organismes concernés, il en est de diploïdes, d'haploïdes et de ceux chez qui alternent les générations haploïdes et diploïdes

Diagramme conceptuel

Dessinez un diagramme conceptuel qui relie entre eux le plus grand nombre possible des termes suivants. Remarquez que les termes ne sont pas présentés dans un ordre particulier.

chromosomes / méiose / ségrégation égale / allèles / diploïde / assortiment indépendant / haploïde / centromère / produits de la méiose / rapport mendélien / attachement de la fibre du fuseau

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Deux drosophiles à ailes normales (transparentes et allongées) sont croisées. La progéniture présente deux phénotypes nouveaux : des ailes sombres (d'aspect opaque) et des ailes «taillées» (aux extrémités droites). Voici les produits du croisement :

Femelles	179 transparentes, allongées
	58 transparentes, taillées
Mâles	92 transparentes, allongées
	89 sombres, allongées
	28 transparentes, taillées
	31 sombres, taillées

a. Donnez une explication génétique de ces résultats ainsi que la représentation des génotypes des parents et de toutes les classes de la descendance.

b. Imaginez une expérience qui permette de tester votre modèle

Solution

a. La première chose à faire est de relever tous les aspects intéressants des résultats. Le premier fait majeur est, bien sûr, l'apparition de deux phénotypes nouveaux. Nous avons déjà rencontré ce phénomène au chapitre 2 et nous l'avons expliqué en termes d'allèles récessifs masqués par des allèles dominants. Nous pourrions donc commencer par la supposition que l'une des mouches parentales, ou les deux, portent des allèles récessifs de deux gènes distincts. Cette inférence est confortée par l'observation que certains des descendants n'expriment qu'un seul des nouveaux phénotypes. Si les nouveaux phénotypes apparaissaient toujours ensemble, nous pourrions supposer qu'ils sont déterminés tous les deux par le même allèle récessif.

Cependant, l'autre donnée majeure qui ressort des résultats et qui ne peut être expliquée sur la base des principes mendéliens exposés au chapitre 2, est la différence de répartition des phénotypes entre les sexes. Bien qu'il y ait approximativement le même nombre de descendants mâles ou femelles, les mâles se répartissent en quatre classes phénotypiques, et les femelles en deux classes seulement. Ceci suggère immédiatement que nous ayons affaire à un cas d'hé-

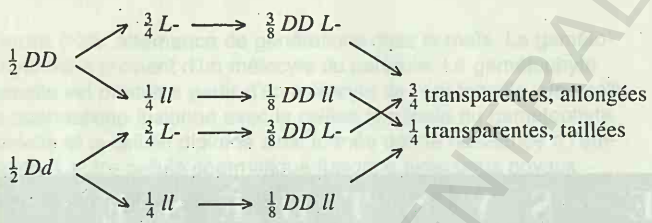
BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

rédité liée au sexe. En nous penchant sur les données, nous voyons que les phénotypes «ailes allongées» ou «ailes taillées» ségrègent chez les mâles et chez les femelles, alors que seuls les mâles peuvent présenter le phénotype «ailes sombres». Ceci indique que le profil de transmission héréditaire de la transparence des ailes diffère de celui de la forme des ailes. Les ailes allongées ou taillées se trouvent dans un rapport 3 :1 chez les mâles et chez les femelles. Ceci peut s'expliquer si les deux parents sont hétérozygotes pour un gène autosomique ; nous pouvons les représenter par *Ll*, *L* désignant l'allèle «aile allongée» et *l* , l'allèle «aile taillée».

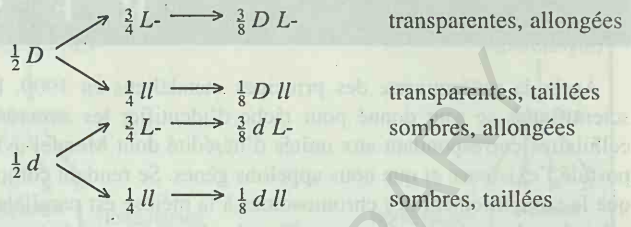
Cette première analyse nous montre que c'est la transmission de la transparence des ailes qui est liée au sexe. La situation la plus probable est que les allèles «aile transparente» (*D*) et «aile sombre» (*d*) se trouvent sur le chromosome X, parce que nous avons vu dans ce chapitre que la localisation d'un gène sur ce chromosome donne lieu à ce type de profil de transmission lié au sexe. Si cette hypothèse est correcte, c'est le parent femelle qui doit porter l'allèle *d* parce qu'un mâle *d* devrait avoir les ailes sombres et ce n'est pas le cas ici. Nous en inférons que le parent femelle devrait être *Dd* et le parent mâle *D*. Voyons si ces génotypes hypothétiques nous donnent les résultats observés. Si la supposition se vérifie, toute la descendance femelle doit hériter de l'allèle *D* du père et avoir des ailes transparentes. C'est ce qui est observé. La moitié des fils devrait avoir des ailes transparentes (allèle *D* maternel) et l'autre des ailes sombres (allèle *d* maternel), ce qui est aussi observé.

Par conséquent, nous pouvons représenter le parent femelle par *Dd Ll* et le parent mâle par *D Ll*. La descendance devrait être

Femelles



Mâles

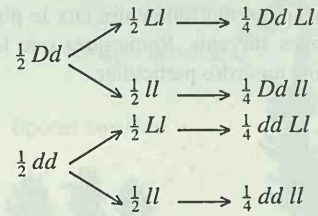


b. La façon classique de tester un tel modèle est d'effectuer un croisement et d'en prédire le résultat. Quel croisement choisir? Nous devons prédire un certain rapport phénotypique dans la descendance, donc il importe que le croisement génère un rapport phénotypique bien particulier et univoque. Remarquons que l'utilisation d'une des femelles de la descendance ne nous aiderait pas : nous ne pouvons déduire le génotype d'aucune des femelles à partir de son phénotype. Celles qui ont les ailes transparentes peuvent être *DD* ou *Dd* et celles qui ont les ailes allongées peuvent être *LL* ou *Ll*. Par contre, il serait intéressant de croiser la femelle parentale avec un de ses fils à ailes sombres et taillées parce que, selon notre modèle, leurs génotypes complets doivent apparaître au phénotype. Nous avons donc

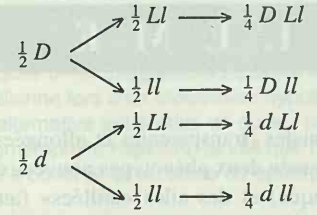
Dd Ll X d ll

A partir de là, nous prédisons :

Femelles

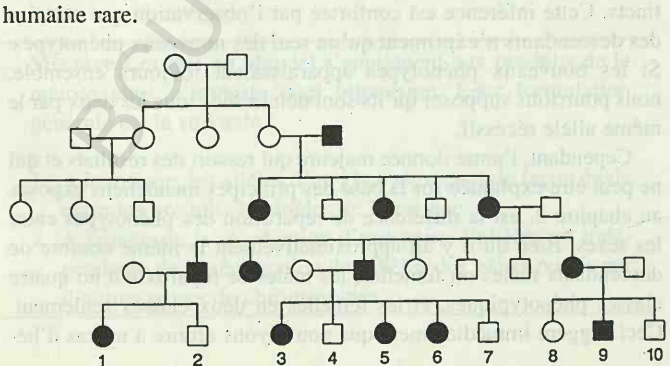


Mâles



PROBLÈMES RÉSOLUS

1. L'arbre généalogique que voici se rapporte à une maladie humaine rare.



a. Déduisez-en le mode probable de transmission héréditaire.

b. Quels seraient les résultats des mariages entre cousins 1 × 9, 1 × 4, 2 × 3 et 2 × 8?

Solution

a. Le mode de transmission le plus probable est la liaison à l'X d'un gène dominant. La dominance est révélée par le fait qu'après l'introduction de la maladie par le mâle à la génération II, chaque génération présente des individus ayant le phénotype malade. La liaison à l'X est révélée par l'absence de transmission du phénotype de père en fils. S'il s'agissait d'un gène autosomique dominant, la trans-

BCU Lausanne / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mission d'un mâle à un autre serait courante. L'hypothèse d'un gène autosomique récessif est, en théorie, plausible, mais requiert trop de suppositions ad hoc. En particulier, voyez les mariages d'individus affectés avec des personnes étrangères à la famille. Si la condition était autosomique récessive, la seule façon pour ces mariages de produire une descendance affectée serait que chaque personne normale entrant par mariage dans la famille soit hétérozygote pour le caractère en question ; les croisements seraient alors : *aa* (affecté) × *Aa* (normal). Toutefois, on nous a dit que la maladie était rare ; il est donc hautement improbable que les hétérozygotes soient aussi fréquents. Il est impossible qu'il s'agisse d'un gène récessif lié à l'X parce que l'union d'une femme affectée avec un homme normal ne pourrait engendrer de filles affectées. Nous pouvons donc représenter l'allèle responsable de la maladie par *A* et l'allèle normal par *a*.

b. 1 × 9 : Le numéro 1 doit être hétérozygote *Aa*, parce qu'elle a dû hériter *a* de sa mère normale. Le numéro 9 doit être *A* Y. Donc le croisement doit être *Aa* ♀ × *A* Y ♂.

Gamètes femelles	Gamètes mâles	Descendance
$\frac{1}{2}A$	$\frac{1}{2}A$	$\frac{1}{4}AA$ ♀
	$\frac{1}{2}$ Y	$\frac{1}{4}A$ Y ♂
$\frac{1}{2}a$	$\frac{1}{2}A$	$\frac{1}{4}Aa$ ♀
	$\frac{1}{2}$ Y	$\frac{1}{4}a$ Y ♂

1 × 4 : Doit être *Aa* ♀ × *a*Y ♂.

Gamètes femelles	Gamètes mâles	Descendance
$\frac{1}{2}A$	$\frac{1}{2}a$	$\frac{1}{4}Aa$ ♀
	$\frac{1}{2}$ Y	$\frac{1}{4}A$ Y ♂
$\frac{1}{2}a$	$\frac{1}{2}a$	$\frac{1}{4}aa$ ♀
	$\frac{1}{2}$ Y	$\frac{1}{4}a$ Y ♂

2 × 3 : Doit être *a* Y ♂ × *Aa* ♀ (identique à 1 × 4).
2 × 8 : Doit être *a* Y ♂ × *aa* ♀ (toute la descendance est normale).

2. Deux plantes de maïs sont étudiées ; l'une est *Aa*, l'autre *aa*. Ces deux plantes sont croisées de deux façons : en utilisant *Aa* comme femelle et *aa* comme mâle ; en utilisant *aa* comme femelle et *Aa* comme mâle.

a. Quels seront les génotypes de l'albumen produits dans chaque croisement? Dans quelles proportions? (L'albumen est 3*n* et est formé par l'union d'un gamète mâle avec les deux noyaux polaires du gamétophyte femelle, voir figure 3-38.)

b. Dans une expérience destinée à étudier les effets «de dose» d'un gène, vous désirez produire des albumens de génotype connu *aaa, Aaa* et *AAA* (contenant respectivement 0, 1 et 2 «doses» de *A*). Quels croisements effectueriez-vous pour obtenir de tels génotypes chez l'albumen?

Solution

a. Dans une question de ce type , nous devons penser à la fois à la méiose et à la mitose. Les méiospores sont produites par méiose ; les noyaux des gamétophytes mâles et femelles des plantes supérieures sont produits par division mitotique du noyau de la méiospore. Nous devons également revoir le cycle de vie du maïs pour savoir quels noyaux fusionnent pour former l'albumen.

Premier croisement : *Aa* ♀ × *aa* ♂

Dans ce cas, la méiose chez la femelle va produire des spores dont une moitié sera *A* et l'autre moitié *a*. Par conséquent un nombre égal de gamétophytes femelles haploïdes à noyau *A* et à noyau *a* seront produits, puisque la mitose reproduit fidèlement le génotype. De la même façon, tous les noyaux des gamétophytes mâles seront *a*. Au cours du cycle de vie du maïs, l'albumen se forme à partir de deux noyaux femelles et d'un noyau mâle, de sorte que deux types d'albumen vont être produits, comme suit :

spore ♀	noyaux polaires ♀	gamètes ♂	albumen 3*n*
$\frac{1}{2}A$	*A* et *A*	*a*	$\frac{1}{2}AAa$
$\frac{1}{2}a$	*a* et *a*	*a*	$\frac{1}{2}aaa$

Deuxième croisement : *aa* ♀ × *Aa* ♂

spore ♀	noyaux polaires ♀	gamètes ♂	albumen 3*n*
toutes *a*	tous *a* et *a*	$\frac{1}{2}A$	$\frac{1}{2}Aaa$
		$\frac{1}{2}a$	$\frac{1}{2}aaa$

Remarquez que les rapports des phénotypes de l'albumen pour le caractère envisagé seraient toujours mendéliens, bien qu'ils recouvrent des génotypes légèrement différents. (Bien sûr, ce type de problème ne se rencontre pas si l'on utilise des caractères d'embryons, puisque les embryons sont diploïdes.)

b. Ce type d'expérience s'est avéré extrêment utile dans l'étude de la génétique et de la biologie moléculaire des plantes. Pour répondre à la question, il nous suffit de réaliser que les deux noyaux polaires femelles haploïdes qui contribuent à former l'albumen sont génétiquement identiques. Pour obtenir des albumens qui seront tous *aaa*, n'importe quel croisement *aa* × *aa* fera l'affaire. Pour obtenir des albumens qui seront tous *Aaa*, le croisement doit être *aa* ♀ × *AA* ♂. Pour obtenir des albumens qui seront tous *AAa*, le croisement doit être *AA* ♀ × aa ♂. Pour *AAA*, n'importe quel croisement *AA* × *AA* conviendra, évidemment. Remarquez que ces génotypes d'albumens peuvent être obtenus par d'autres croisements, mais alors combinés à d'autres génotypes.

BIBLIOTECA CENTRAL UNIVERSIDAD NACIONAL

PROBLÈMES

1. Quelles sont les principales différences entre la mitose et la méiose?

2. Si une mitose se produit dans une cellule de génotype *Aa Bb Cc,* où toutes les paires de gènes sont sur des paires de chromosomes différentes, quels seront les génotypes des cellules résultantes?

3. Chez des levures haploïdes, on croise une souche pourpre (ad^-) de signe conjugant *a* et une souche blanche (ad^+) de signe conjugant α. Si ad^- et ad^+ constituent une paire de gènes et *a* et α une paire indépendante de la première, sur une autre paire de chromosomes, quelle descendance peut-on prévoir et dans quelles proportions?

4. Chez *Drosophila*, l'allèle récessif *s* détermine la formation d'ailes anormalement petites et l'allèle s^+ la formation d'ailes normales. On sait que ce gène est lié à l'X. Si un mâle à ailes petites est croisé avec une femelle normale, à quel rapport entre mouches normales et à ailes petites doit-on s'attendre pour chaque sexe à la F1 et à la F2? Quel résultat peut-on prédire si les femelles de la F1 sont rétrocroisées avec leur père?

5. Expliquez où se produisent la mitose et la méiose chez une fougère, une plante à fleurs, un pin, un champignon, une grenouille, un papillon et un escargot.

6. Les cellules humaines possèdent normalement 46 chromosomes. Précisez le nombre de chromosomes présents à chacun des stades suivants : a. La métaphase de la mitose ; b. La métaphase I de la méiose ; c. La télophase de la méiose ; d. La télophase I de la méiose ; e. La télophase II de la méiose (Dans vos réponses, comptez les chromatides comme des chromosomes).

7. Quatre des événements suivants se produisent tant à la méiose qu'à la mitose, mais l'un d'entre eux ne se produit qu'à la méiose. Lequel? a ; Formation de chromatides ; b. Formation du fuseau ; c. Condensation des chromosomes (raccourcissement et épaississement) ; d. Migration des chromosomes vers les pôles ; e. Appariement des chromosomes.

8. Supposons que deux anomalies cytologiques intéressantes et *rares* soient découvertes dans le caryotype d'un mâle humain. Un des chromosomes de la paire 4 possède un segment supplémentaire (ou satellite), et un des chromosomes de la paire 7 présente un profil de coloration anormal. A supposer que tous les gamètes de ce mâle soient également viables, quelle proportion de ses enfants présenteront-ils le même caryotype que lui? (Un caryotype est le complément chromosomique total visible.)

9. Supposons que la méiose ait lieu lors du stade diploïde transitoire d'un organisme haploïde ayant *n* chromosomes. Quelle est la probabilité qu'un individu haploïde résultant de la division méiotique hérite d'un jeu complet de centromères parentaux (c'est-à-dire un jeu provenant entièrement de l'un ou de l'autre parent)?

10. En supposant que les chromosomes sexuels soient identiques, quelle proportion de tous vos gènes avez-vous en commun avec : a. votre mère b. votre frère?

11. Une femelle sauvage de Troll qui est gracieuse (*G*) est croisée avec un mâle non sauvage qui est horrible (*g*). Leur descendance est entièrement constituée de mâles gracieux et de femelles horribles. Interprétez ces résultats et donnez les génotypes.

(Le problème 11 est extrait de *The Challenge of Genetics* de E.H. Simon et H. Grossfield, Addison-Wesley, 1971.)

12. Un homme affligé d'une certaine maladie épouse une femme normale. Ils ont huit enfants (quatre garçons et quatre filles) ; toutes les filles ont la maladie de leur père, mais aucun des garçons ne l'a. Quelle hérédité est-elle suggérée? **a.** Autosomique récessive **b.** Autosomique dominante **c.** Liée à l'Y **d.** Dominante liée à l'X **e.** Récessive liée à l'X.

13. L'hypophosphatémie est provoquée par un gène dominant lié à l'X chez les humains. Un homme atteint d'hypophosphatémie épouse une femme normale. Quelle proportion de leurs fils aura-t-elle l'hypophosphatémie? **a.** $\frac{1}{2}$ **b.** $\frac{1}{4}$ **c.** $\frac{1}{3}$ **d.** 1 **e.** 0

14. Une condition connue sous le nom d'ichtyosis hystrix gravior s'est manifestée chez un petit garçon au début du dix-huitième siècle. Sa peau devint très épaisse et se couvrit d'épines lâches dont elle se dépouillait périodiquement. Devenu adulte, cet «homme porc-épic» se maria et eut six fils présentant tous cette condition, et plusieurs filles, toutes normales. Pendant quatre générations, cette condition fut transmise de père en fils. Sur la base de ces données, quelle hypothèse pouvez-vous proposer en ce qui concerne la localisation du gène?

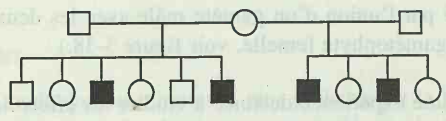
15. La dystrophie musculaire de Duchenne est liée au sexe et n'affecte habituellement que les mâles. Les victimes de cette maladie s'affaiblissent progressivement dès le début de leur vie.

a. Quelle est la probabilité qu'une femme dont le frère a la maladie de Duchenne ait un enfant atteint?

b. Si le frère de votre mère (votre oncle) avait la maladie de Duchenne, quelle est la probabilité que vous ayez hérité du gène?

c. Si le frère de votre père avait la maladie, quelle est la probabilité que vous ayez hérité du gène?

16. Le pedigree que voici concerne une anomalie dentaire héréditaire, amelogenesis imperfecta.



a. Quel type d'hérédité rend-il le mieux compte de la transmission de ce trait?

b. Décrivez le génotype des différents individus selon votre hypothèse.

17. Un gène récessif *c* lié au sexe est responsable du daltonisme chez l'être humain. Une femme normale dont le père était daltonien épouse un daltonien.

a. Quels génotypes la mère de l'époux daltonien peut-elle avoir?

b. Quelle est la probabilité que le premier enfant de ce mariage soit daltonien?

c. A quel pourcentage de filles daltoniennes issues de cette union peut-on s'attendre?

d. Quelle proportion des enfants (des deux sexes) issus de ce mariage aura-t-elle une perception normale des couleurs?

18. Les chats domestiques mâles sont noirs ou oranges ; les femelles sont noires, tachetées jaune et noir ou oranges.

a. Si ces couleurs sont déterminées par un gène lié au sexe, comment peut-on expliquer ces observations?

b. En utilisant les symboles appropriés, établissez les phénotypes attendus dans la progéniture d'un croisement entre un mâle noir et une femelle orange.

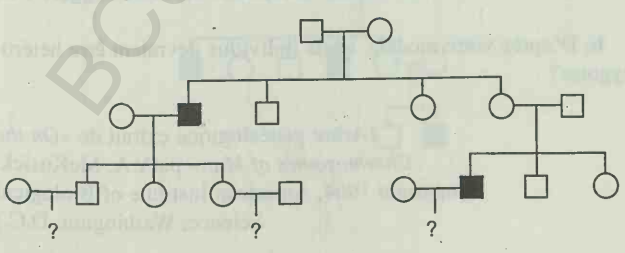
c. Faites de même pour le croisement réciproque.

d. Une moitié des femelles issues d'un croisement donné est tachetée jaune et noir, l'autre moitié est noire ; une moitié des mâles est orange et l'autre moitié noire. De quelle couleur sont les parents mâle et femelle?

e. Un autre croisement produit une descendance présentant les proportions que voici : $\frac{1}{4}$ de mâles oranges, $\frac{1}{4}$ de femelles oranges, 1/4 de mâles noirs et $\frac{1}{4}$ de femelles tachetées noires et jaunes. De quelle couleur sont les parents mâle et femelle?

19. Un homme est hétérozygote pour un paire de gènes autosomiques *Bb* et porte un un gène récessif *d* lié à l'X. Quelle proportion de ses spermatozoïdes sera-t-elle *bd* ? **a.** 0 **b.** $\frac{1}{2}$ **c.** $\frac{1}{8}$ **d.** $\frac{1}{16}$ **e.** $\frac{1}{4}$.

20. La généalogie que voici se rapporte à une affection rare, débilitante mais non fatale.

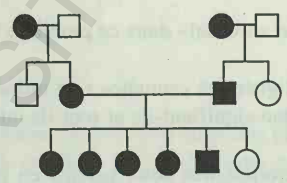


a. déterminez le mode de transmission de cette affection.

b. Décrivez le génotype de chaque individu en fonction du schéma héréditaire que vous avez proposé.

c. Si vous étiez le médecin de famille, que diriez-vous aux trois couples concernés de la probabilité d'avoir un enfant atteint?

21. Supposons que l'arbre généalogique que voici soit directement interprétable, dépourvu de complications du type enfants illégitimes. Le phénotype W, rencontré chez les individus représentés par les symboles pleins, est rare dans la population considérée dans son ensemble. Quels schémas de transmission de W sont-ils compatibles avec ce pedigree? Lesquels sont-ils exclus? a. Autosomique récessif b. Autosomique dominant c. Récessif lié à l'X d. Dominant lié à l'X e. Lié à l'Y.



(Le problème 21 est extrait de *General Genetics* , 2ème édition, de A.M. Srb, R.D. Owen & R.S. Edgar, Copyright © 1965, W.H. Freeman & Cy.)

22. Un allèle mutant est à l'origine d'une queue tordue chez la souris. Six paires de souris sont croisées. Leurs phénotypes et ceux de leur descendance sont donnés ci-dessous. N est le phénotype normal, B est le phénotype tordu. Déduisez le mode de transmission de ce phénotype.

	Parents		Descendance	
Croisement	♀	♂	♀	♂
1	N	B	Tous B	Tous N
2	B	N	$\frac{1}{2}$ B, $\frac{1}{2}$ N	$\frac{1}{2}$ B, $\frac{1}{2}$ N
3	B	N	Tous B	Tous N
4	N	N	Tous N	Tous N
5	B	B	Tous B	Tous B
6	B	B	Tous B	$\frac{1}{2}$ B, $\frac{1}{2}$ N

a. Est-il récessif ou dominant?

b. Est-il autosomique ou lié au sexe?

c. Quels sont les génotypes des parents et des descendants dans tous les croisements décrits dans le tableau?

23. Chez *Drosophila,* la couleur normale de l'oeil est rouge, mais des souches anormales à oeil brun peuvent être obtenues. De même, les ailes sont normalement longues, mais des souches à ailes courtes sont disponibles. Une femelle d'une lignée pure à oeil brun et ailes courtes est croisée avec un mâle d'une lignée pure normale. La F1 est composée de femelles normales et de mâles à ailes courtes. Dans la F2 qui est alors produite, les mouches des

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

deux sexes présentent les rapports phénotypiques suivants :

$\frac{3}{8}$ à oeil rouge et ailes longues
$\frac{3}{8}$ à oeil rouge et ailes courtes
$\frac{1}{8}$ à oeil brun et ailes longues
$\frac{1}{8}$ à oeil brun et ailes courtes

Déduisez le schéma de transmission de ces caractères en utilisant des symboles génétiques bien définis de votre invention. Donnez les génotypes des trois générations et leurs rapports chez la F1 et la F2.

Décomposons le problème

Avant de résoudre le problème, essayez de répondre aux questions suivantes.

a. Que signifie «normal» dans ce problème?

b. Les mots «lignée» et «souche» sont utilisés tous deux dans l'énoncé. Que signifient-ils et sont-ils interchangeables?

c. Faites un croquis des deux parents en représentant leurs yeux, leurs ailes et leurs différences sexuelles.

d. Combien de caractères entrent en jeu dans ce problème?

e. Combien de phénotypes interviennent-ils dans ce problème et à quels caractères sont-ils associés?

f. Quel est le phénotype complet des femelles «normales» de la F1?

g. Quel est le phénotype complet des mâles «à ailes courtes» de la F1?

h. Etablissez les rapports phénotypiques en F2 pour tous les caractères que vous avez identifiés au point d.

i. Que déduisez-vous de ces rapports?

j. Quel est le schéma de transmission héréditaire principal qui distingue l'hérédité liée au sexe de l'hérédité autosomique?

k. Est-ce que les caractéristiques de la F2 suggèrent un tel schéma?

l. Est-ce que les caractéristiques de la F1 suggèrent un tel schéma?

m. Quelles relations de dominance/récessivité déduisez-vous de la F1? De la F2?

n. En fonction de quelles règles désignez-vous les allèles sauvages dans le symbolisme que vous appliquez à ces croisements?

o. Que signifie «déduire le schéma de transmission de certains phénotypes»?

Essayez à présent de résoudre le problème. Si vous n'y parvenez pas, faites une liste de questions à propos des notions que vous ne comprenez pas, relisez les concepts-clés au début du chapitre et identifiez ceux qui ont trait à vos questions. Si cela ne vous aide pas, faites de même avec les messages de ce chapitre.

24. Les ailes de la phalène *Abraxas* de type sauvage (W) sont parsemées de grandes taches. Par contre, la variété «laiteuse» (L) de cette espèce est caractérisée par de très petites taches. Des croisements entre souches qui diffèrent au niveau de ce caractère donnent les résultats suivants :

	Parents		Descendance	
Croisement	♀	♂	F1	F2
1	L	W	♀ W	♀ $\frac{1}{2}$ L, $\frac{1}{2}$ W
			♂ W	♂ W
2	W	L	♀ L	♀ $\frac{1}{2}$ W, $\frac{1}{2}$ L
			♂ W	♂ $\frac{1}{2}$ W, $\frac{1}{2}$ L

Donnez une explication génétique claire de ces résultats en précisant les génotypes de toutes les classes d'individus.

25. Deux allèles du gène qui code pour l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) sont communs dans les populations méditerranéennes et africaines. L'un des allèles spécifie une enzyme possédant une activité G6PD normale ; l'autre allèle code pour une enzyme dont l'activité G6PD est réduite, ce qui confère la résistance à la malaria.

L'examen microscopique des globules rouges du sang d'une femme africaine montre que la moitié contient des parasites de la malaria et que l'autre moitié a une apparence normale. Proposez une explication génétique de cette observation.

26. La littérature médicale décrit le cas intéressant d'une femme dont le sein droit était plus gros que le gauche, dont la moitié droite du pubis était glabre et qui souffrait d'irrégularités menstruelles. Une enquête sur sa famille a révélé qu'un frère, un fils et un petit-fils présentaient le syndrome de féminisation testiculaire. Une de ses filles a eu trois fils normaux. Etablissez un arbre généalogique à partir de cette information en déterminant s'il se conforme au mode d'hérédité décrit dans ce chapitre, et réfléchissez à la cause possible des symptômes présentés par le propositus.

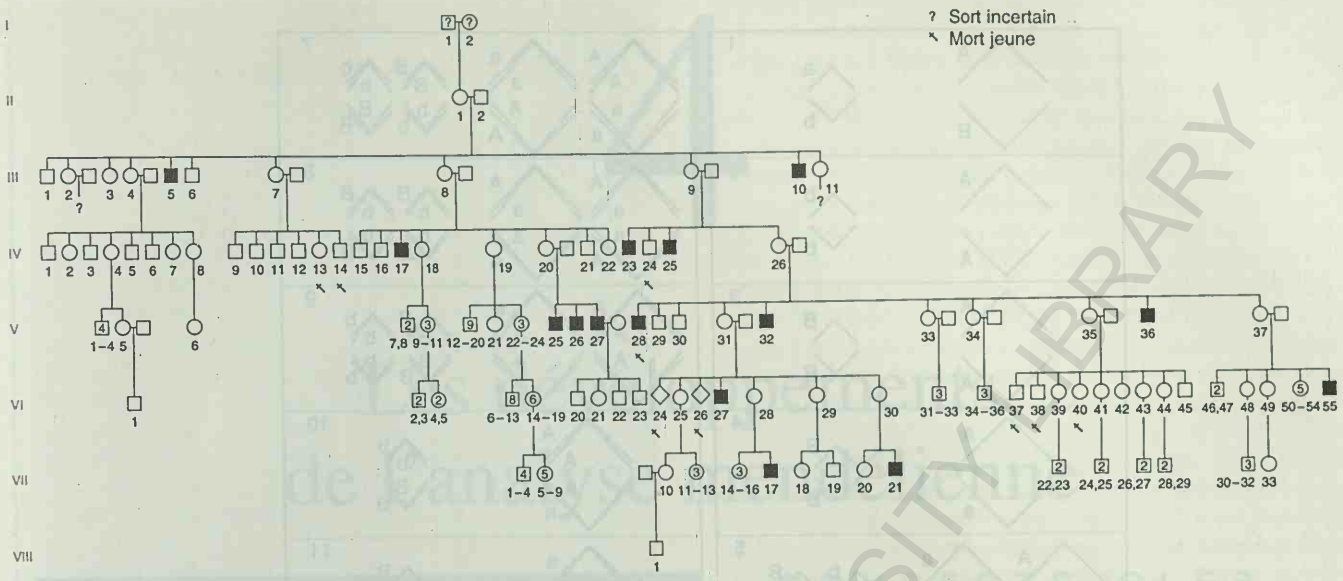
27. L'arbre généalogique en haut de la page ci-contre décrit la transmission d'une affection humaine rare appelée paraplégie spastique ; Il s'agit d'une maladie nerveuse caractérisée par une déficience de coordination motrice.

a. Quel mode de transmission héréditaire cet arbre suggère-t-il?

b. D'après votre modèle, quels individus devraient être hétérozygotes?

(Arbre généalogique extrait de «*On the Chromosomes of Man*» parV.A. McKusick, Copyright 1964, American Institute of Biological Science, Washington, D.C.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



28. L'arbre généalogique ci-dessous montre le profil de transmission d'une maladie humaine rare. Ce profil correspond-il à la transmission d'un allèle récessif lié à l'X ou d'un allèle autosomique dominant dont l'expression est limitée aux mâles?

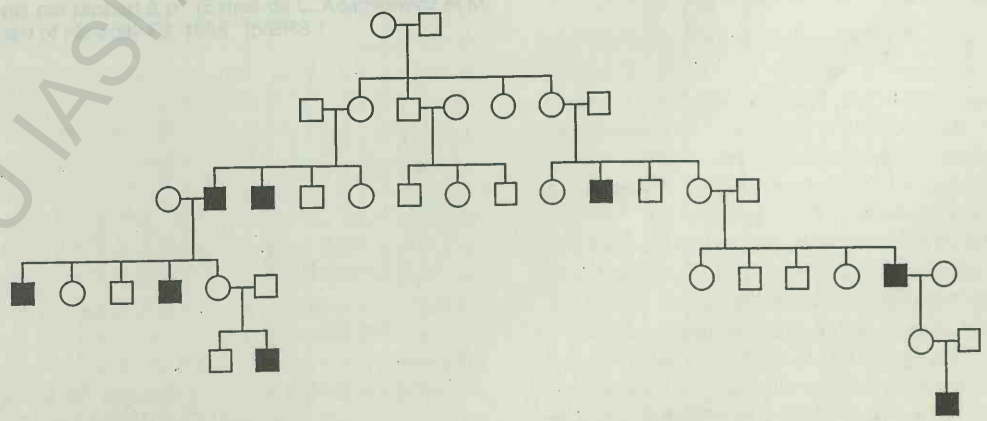
(Arbre généalogique adapté de *Genetic Notes* , 6th ed.par J.F. Crow, Copyright 1967,Burgers Publishing Company, Minneapolis.)

29. Supposons que nous sommes en 1868. Vous êtes un fabricant de lentilles optiques jeune et doué. Grâce à la qualité de vos nouvelles lentilles, vous venez de construire un microscope dont le pouvoir de résolution est nettement supérieur à celui de tous les autres instruments existants. Pour essayer votre microscope, vous avez examiné les cellules des testicules de sauterelles et vous avez été fasciné par le comportement d'étranges structures allongées que vous avez observées dans les cellules en cours de division. Un jour, à la bibliothèque, vous lisez un article récent de G. Mendel sur des «facteurs» hypothétiques qui lui permettraient d'expliquer les résultats de certains croisements entre des plantes de pois. Vous avez la révélation soudaine du parallélisme qui existe entre vos observations sur les sauterelles et les résultats de Mendel et vous décidez de lui écrire. Qu'écrivez-vous dans votre lettre?

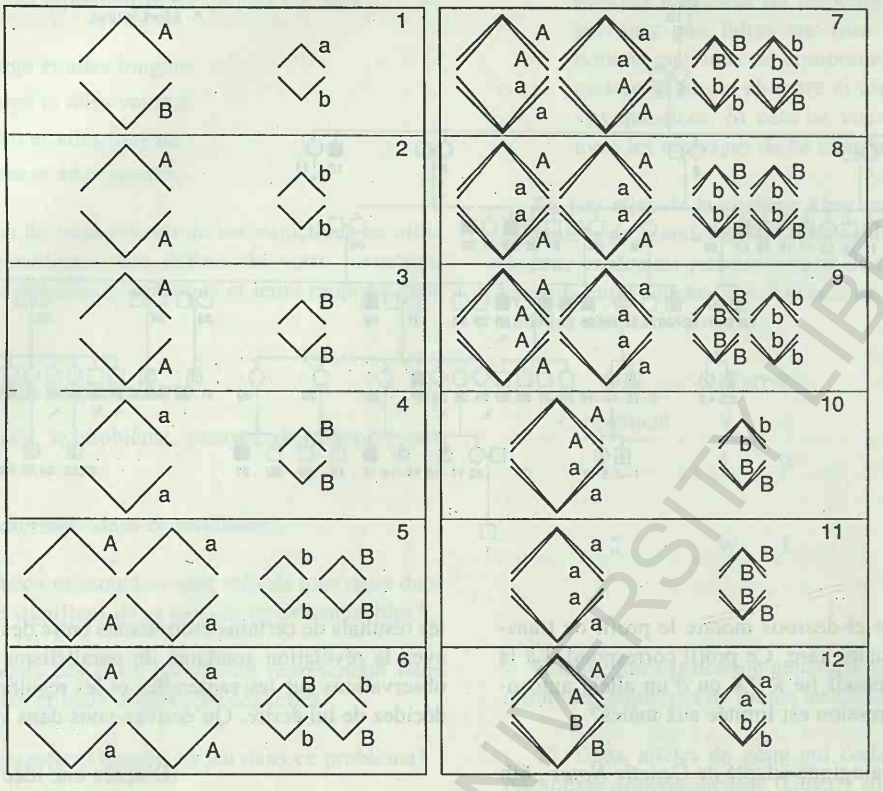
(D'après une idée de Ernest Kroecker.)

*30. Chez l'être humain, la perception de la couleur dépend de gènes qui codent pour trois pigments. Les gènes *R* (pigment rouge) et *G* (pigment vert) sont sur le chromosome X et le gène *B* (pigment bleu) est autosomique. Une mutation dans n'importe lequel de ces gènes peut provoquer le daltonisme. Supposez qu'un homme daltonien épouse une femme qui perçoit normalement les couleurs. Tous leurs fils sont daltoniens et toute leurs filles sont normales. Donnez les génotypes des deux parents et de tous leurs enfants en expliquant votre raisonnement. (Dessinez un arbre généalogique.)

(Problème proposé par Rosemary Redfield.)

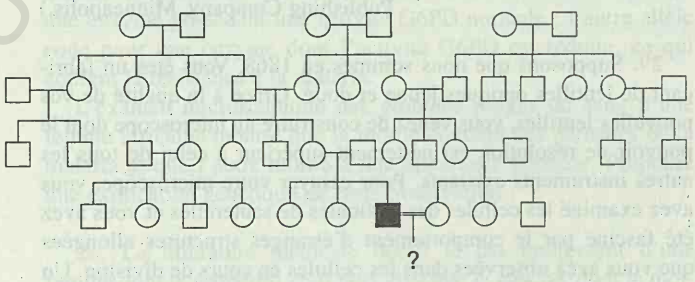


BCU IASI / CETIBA UNIVERSITY LIBRARY



31. La plante *Haplopappus gracilis* est diploïde et $2n=4$. Elle possède une paire de chromosomes longs et une paire de chromosomes courts. Les croquis ci-dessus représentent l' anaphase (la migration vers les pôles) mitotique ou en méiotique dans des cellules individuelles provenant de plantes dihybrides (*Aa Bb*) pour des gènes situés sur des chromosomes différents. Les traits représentent des chromosomes ou des chromatides, et les pointes des V correspondent aux centromères. Pour chaque cas, indiquez si le schéma décrit une cellule en méiose I, en méiose II ou en mitose. Si un croquis représente une situation qui ne peut exister, dites - le.

32. Une forme de surdité humaine héréditaire est récessive liée à l'X. Un homme atteint par cette maladie épouse une femme normale et ils attendent un enfant. Ils découvrent alors qu'ils sont parents



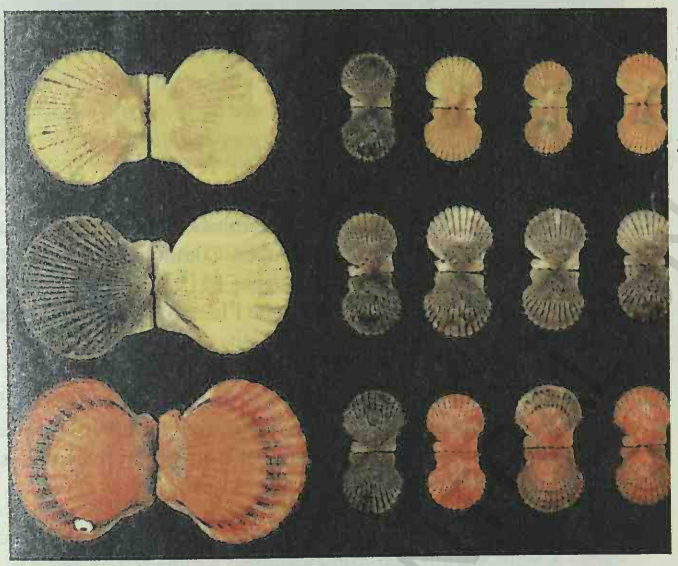
éloignés. Une partie de l'arbre généalogique de leur famille est représentée ici. Quelle information donneriez - vous à ce couple quant à la probabilité d'avoir un petit garçon sourd, une petite fille sourde, un petit garçon normal ou une petite fille normale? Expliquez cette information.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

4

Les développements de l'analyse mendélienne



Variation de la couleur de la coquille chez le peigne de Long Island (*Argopecten irradians*) due à trois allèles d'un seul gène. Les couleurs jaune, noir et orange sont déterminées respectivement par les allèles p^y, p^b et p^o. Les séries de petites coquilles représentent les proportions obtenues après autofécondation d'individus de génotype $p^y p^b$ (rangée supérieure, $p^b p^b$ (rangée médiane) et $p^o p^b$ (rangée inférieure). Ces résultats illustrent les relations entre allèles et montrent que p^y et p^o sont dominants par rapport à p^b. (Extrait de L. Adamkewicz et M. Castagna, *Journal of Heredity* 79, 1988, 15/BPS.)

CONCEPTS-CLÉS

- Un gène peut avoir plus de deux allèles.
- Le phénotype de certains hétérozygotes peut présenter une forme de dominance différente de la dominance complète
- De nombreux gènes présentent des formes alléliques qui peuvent entraîner la mort de l'organisme.
- La plupart des caractères sont déterminés par l'interaction des gènes les uns avec les autres et avec le milieu.
- Les interactions géniques s'identifient par des modifications dans les rapports mendéliens.

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

Nous avons montré que les lois de Mendel apparaissent comme valables pour l'ensemble des organismes eucaryotiques, c'est-à-dire que nous pouvons identifier chez la plupart des eucaryotes des phénomènes analogues découlant de la ségrégation et de l'assortiment indépendant. Ces lois constituent donc une base pour prédire les résultats de croisements simples. Cependant, il ne s'agit que d'une base ; le monde réel des gènes et des chromosomes est plus complexe que celui suggéré par les seules lois de Mendel, et les exceptions comme les prolongements abondent. Ces situations ne rendent pas les lois de Mendel caduques, mais indiquent plutôt qu'un plus grand nombre de cas peuvent s'expliquer par la ségrégation et l'assortiment indépendant de paires de gènes et que ces cas doivent être traités selon les principes de l'analyse génétique. Ceci est la tâche qui nous incombe à présent. Un cas précis — celui de la liaison au sexe ou, en employant le terme anglais, sex linkage — a déjà été pris en compte. Ce chapitre inclut un ensemble d'autres développements, dus principalement à la complexité du mode d'expression des gènes et les deux chapitres suivants traiteront de deux prolongements supplémentaires. Nous verrons que plutôt que de créer une situation terriblement confuse, ces complexités s'inscrivent dans un ensemble précis et unique, celui des principes de l'analyse génétique. Ces principes s'articulent les uns aux autres d'une manière très satisfaisante pour contribuer à une connaissance approfondie des mécanismes de l'hérédité.

Variations de la dominance

Le concept de dominance est un bon point de départ. Mendel observa (ou du moins mentionna) la dominance complète (et la récessivité) pour chacune des sept paires de gènes qu'il avait envisagées dans son étude. Les variations dans l'expression de la dominance seront illustrées par quelques examples.

Les «belles de nuit» sont des plantes originaires d'Amérique tropicale dont les fleurs s' ouvrent en fin de journée. Lorsqu'une lignée pure à pétales rouges est croisée avec une lignée pure à pétales blancs, la F_1 se caractérise par des pétales roses! Si une F_2 est obtenue en croisant les plantes F_1 entre elles, sa composition est la suivante

$\frac{1}{4}$ des plantes ont des pétales rouges
$\frac{1}{2}$ des plantes ont des pétales roses
$\frac{1}{4}$ des plantes ont des pétales blancs

Le rapport 1:2:1 observé en F_2 nous permet de déduire que deux allèles d'un seul gène sont à la base de ce cas d'hérédité. Cependant, les hétérozygotes (la F_1 et une moitié de la F_2) présentent un phénotype intermédiaire, suggérant une **dominance incomplète.** En utilisant des symboles sans connotation de dominance, nous pouvons classer les génotypes des belles de nuit dans cette expérience en C_1C_1 (rouges), C_2C_2 (blancs) et C_1C_2 (roses) . (Des caractères en indice ou en exposant sont souvent utilisés pour indiquer les formes alléliques). La dominance incomplète correspond à la situation où le phénotype de l'hétérozygote est intermédiaire entre ceux des deux homozygotes sur une «échelle» de mesure du phénotype. La figure 4-1 donne des termes correspondant à des positions théoriques sur l'échelle, mais en pratique il est difficile de déterminer exactement où se situe l'hétérozygote sur une telle échelle.

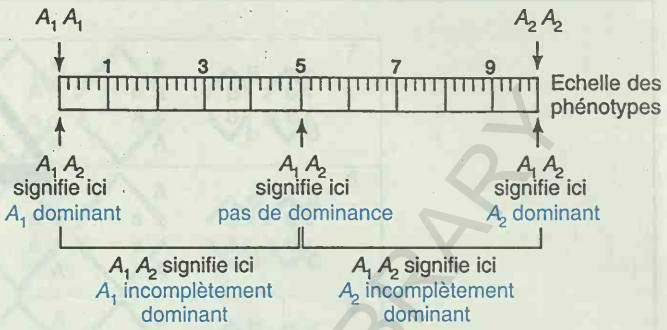


Figure 4-1. Résumé des relations de dominance. La règle représente une mesure du phénotype comme le serait une quantité de pigment.

Le phénotype de l'hétérozygote est aussi la clef du phénomène de **codominance.** En effet l'hétérozygote exprime à la fois le phénotype des *deux* homozygotes. D'une certaine façon la codominance implique qu'il n'y a pas de dominance du tout. Un bon exemple est donné par la paire de gènes des groupes sanguins M-N. Trois groupes sanguins sont représentés — M, N et MN — et ils sont déterminés respectivement par les génotypes L^ML^M, L^NL^N, L^ML^N. Les groupes sanguins sont en fait déterminés par la présence d'un antigène à la surface des globules rouges. Comme spécifié par leur génotype, les individus ont soit l'antigène M (L^ML^M) ou l'antigène N (L^NL^N), ou les deux (L^ML^N). Puisque l'hétérozygote exprime les deux phénotypes, les deux allèles sont dits codominants.

Un autre exemple intéressant de dominance a trait à l'anémie à cellules falciformes chez l'homme. La paire de gènes impliquée affecte le constituant majeur des globules rouges, l'hémoglobine, la protéine transporteuse d'oxygène. Les trois génotypes possibles correspondent à différents phénotypes. A savoir :

Hb^AHb^A : Normal. Globules rouges jamais falciformes.

Hb^SHb^S : Anémie sévère, souvent fatale. Globules rouges falciformes.

Hb^AHb^S : Pas d'anémie. Globules rouges falciformes ne se présentant qu'aux faibles concentrations d'oxygène.

Un exemple de cellules falciformes est montré à la figure 4-2. En ce qui concerne l'anémie, l'allèle Hb^A est dominant. Si l'on envisage la forme des cellules sanguines, la dominance est incomplète . Finalement, en considérant l'hémoglobine elle-même, on peut parler de codominance! En effet, les allèles Hb^A et Hb^S codent pour deux formes légèrement différents d'hémoglobine et ces deux formes sont présentes chez l'hétérozygote, montrant que les allèles sont codominants. Les différentes formes d'hémoglobine peuvent être visualisées grâce à la technique d'électrophorèse par laquelle des molécules de charge et de taille différentes sont séparées (Figure 4-3). Les formes A et S de l'hémoglobine ont des charges différentes, et sont donc séparables par électrophorèse (Figure 4-4).

Les individus homozygotes normaux ont un type d'hémoglobine (A) et les anémiques se caractérisent par le type S qui migre plus lentement dans le champ électrique. Les hétérozygotes pré-

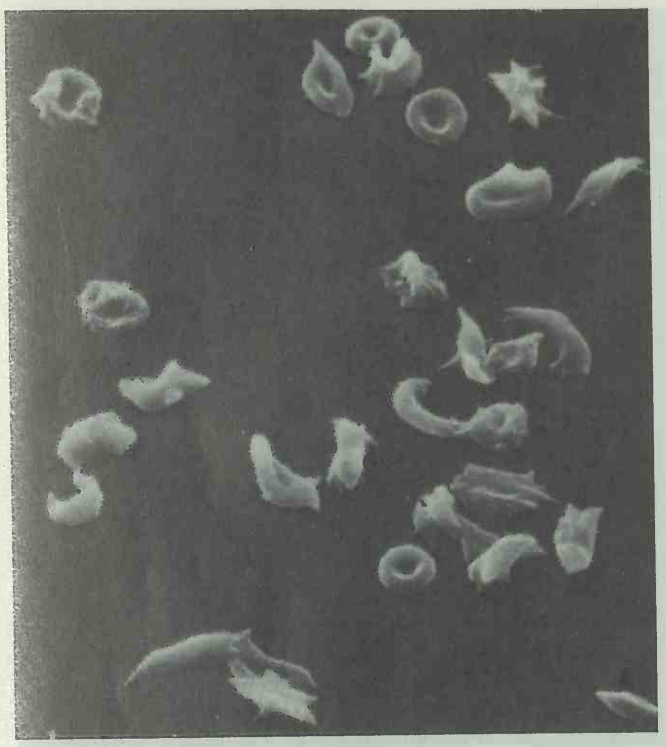


Figure 4-2. Microphotographie électronique de globules rouges d'un individu souffrant d'anémie à cellules falciformes. Quelques cellules arrondies sont quasi-normales. (Avec l'aimable autorisation de Patricia N. Farnsworth.)

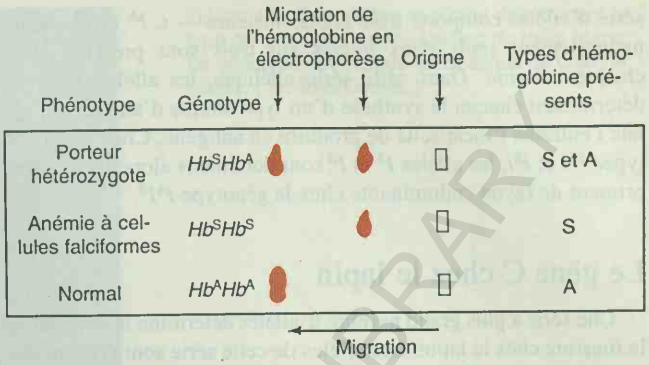


Figure 4-4. Electrophorèse de l'hémoglobine d'un individu normal, d'un individu souffrant d'anémie à cellules falciformes et d'un individu porteur hétérozygote du gène de cette maladie. Les taches montrent la position jusqu' à laquelle les molécules d'hémoglobine migrent dans le gel d'amidon.

Message La dominance complète et la récessivité ne constituent pas des aspects essentiels des lois de Mendel; ces lois ont trait aux modes d'hérédité des gènes et non à leur fonction.

sentent à la fois les types A et S_1. En d'autres termes, la codominance s'exprime au niveau moléculaire.

Le cas de l'anémie à cellules falciformes illustre bien le caractère arbitraire des termes de dominance incomplète et de codominance. Le type de dominance dépend en fait du niveau phénotypique auquel les observations sont faites : celui de l'organisme, de la cellule ou de la molécule.

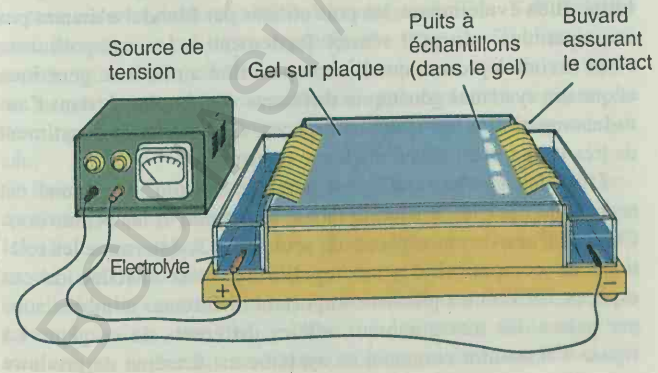


Figure 4-3. Equipement d'électrophorèse. Chaque échantillon est placé dans un puits dans le gel. Les composants de l'extrait migrent différemment dans le gel selon leur charge électrique. Plusieurs extraits peuvent être testés en même temps (un par puits). La position des composants après séparation est révélée par coloration.

Les séries d'allèles multiples

Il apparut très tôt dans l'histoire de la génétique que les gènes se rencontraient sous plus de deux formes. Bien que seuls deux allèles d'un gène puissent être présents dans une cellule diploïde (et un seul dans une cellule haploïde), le nombre total possible de formes alléliques différentes dans une population d'individus est souvent très grand. Cette situation est dénommée **allélisme multiple** et l'ensemble des allèles impliqués constitue une **série allélique.** La notion d'allélisme est cruciale en génétique, de telle sorte que nous en considérerons plusieurs exemples qui serviront aussi à introduire des aspects importants de l'analyse génétique.

Groupes sanguins ABO chez l'homme

Le groupe sanguin ABO chez l'homme constitue un exemple d'allélisme multiple. Quatre types de groupes sanguins (ou phénotypes) sont représentés dans le système ABO (tableau 4-1). La

Tableau 4-1. Groupes sanguins ABO chez l'homme

Phénotype sanguin	Génotype
O	ii
A	I^AI^A ou I^Ai
B	I^BI^B ou I^Bi
AB	I^AI^B

BOURSIN / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

série d'allèles comporte trois allèles majeurs — *i*, I^A et I^B - mais naturellement seuls deux allèles sur trois sont présents chez chaque individu. Dans cette série allélique, les allèles I^A et I^B déterminent chacun la synthèse d'un type unique d'antigène: l'allèle *i* entraîne l'incapacité de produire un antigène. Chez les génotypes I^Ai et I^Bi, les allèles I^A et I^B sont dominants alors qu'ils s'expriment de faÿon codominante chez le génotype I^AI^B.

Le gène C chez le lapin

Une série à plus grand nombre d'allèles détermine la couleur de la fourrure chez le lapin. Les allèles de cette série sont *C* (complètement coloré), c^{ch} (chinchilla, de couleur gris clair), c^h (himalayen, albinos aux extrémités noires) et *c* (albinos). Vous vous rendez compte ici de l'intérêt d'indiquer les allèles par un indice. Plus de deux symboles (*C* et *c*) sont nécessaires pour décrire les allèles multiples. Dans cette série, chaque allèle est dominant par rapport à ceux désignés après lui dans l' ordre *C*, c^{ch}, c^h, *c*. Vérifiez ce point en étudiant soigneusement le tableau 4-2.

Le test d'allélisme

Après ces deux exemples de séries alléliques, il est temps de considérer la question suivante. Comment savons-nous qu'un ensemble de phénotypes est déterminé par des allèles du même gène ? En d'autres mots, en quoi consiste le test d'allélisme ? La réponse réside dans l'observation des rapports mendéliens monofactoriels F_2 pour toutes les possibilités de combinaisons. Par exemple, considérons trois phénotypes chez une espèce végétale hypothétique. La lignée 1 présente des taches rondes sur les pétales ; la lignée 2 des taches ovales, et la lignée 3 n'a pas de taches. Supposons que les croisements entre ces trois lignées donnent les résultats suivants :

Croisement	F_1	F_2
1 × 2	tous à taches rondes	$\frac{3}{4}$ rondes $\frac{1}{4}$ ovales
1 × 3	tous à taches rondes	$\frac{3}{4}$ rondes $\frac{1}{4}$ sans taches
2 × 3	tous à taches ovales	$\frac{3}{4}$ ovales $\frac{1}{4}$ sans taches.

Ces résultats prouvent que nous avons affaire à trois allèles d'un seul gène affectant la formation de taches sur les pétales puisque chaque croisement aboutit à un rapport F_2 de type monohybride. L'ordre de la dominance des allèles est ronde > ovale > sans taches. Nous pouvons choisir n'importe quel type de symbole. Puisque nous ne savons pas quel est le phénotype sauvage, nous pouvons, selon le système en usage chez le lapin, utiliser *S* pour l'allèle conférant des taches rondes, s^o pour l'allèle à taches ovales et *s* pour l'allèle sans taches. Ou bien nous pourrions utiliser S^r pour l'allèle à taches rondes, S^o pour l'allèle à taches ovales et s pour l'allèle sans taches. Il n'y a pas de règles strictes sur le point de savoir si des lettres capitales ou minuscules doivent être utilisées, particulièrement dans le cas d'allèles de milieu de série qui sont dominants vis-à-vis de certains de leurs allèles mais récessifs vis-à-vis d'autres.

Tableau 4-2. Le gène C chez le lapin

Phénotype couleur de la fourrure	Génotype
Complètement coloré	*CC* ou Cc^{ch} ou Cc^h ou *Cc*
Chinchilla	$c^{ch}c^{ch}$ ou $c^{ch}c^h$ ou $c^{ch}c$
Himalayen	c^hc^h ou c^hc
Albinos	*cc*

Que se passe-t-il si les croisements entre lignées pour un caractère déterminé ne produisent pas de rapports monohybrides en F_2? Ce type de résultats est envisagé plus loin dans ce chapitre.

Les chevrons chez le trèfle

Le trèfle est le nom commun des plantes du genre *Trifolium* qui comporte de nombreuses espèces. Certaines sont originaires d'Europe; d'autres ont été introduites. De nombreux travaux de génétique ont été menés sur le trèfle blanc, qui montre une variation importante entre individus en ce qui concerne le curieux motif en «V», ou chevron, décelable sur les folioles. La figure 4-5 montre que chez cette espèce une série allélique est responsable des différentes formes de chevron (et de leur absence). Observez les photographies pour y déceler le type de dominance, si c'est le cas, pour chaque allèle. Classez les allèles de telle faÿon que les relations de dominance soient apparentes. Y a-t-il des incertitudes ? Les données photographiques nous permettent-elles de décrire l'allèle *v* comme dominant ou récessif ?

Allèles d'incompatibilité chez les plantes

On sait depuis des millénaires que certaines plantes ne peuvent s'autoféconder. Telle plante produira des gamètes mâles et femelles, mais jamais de graines. La même plante peut cependant se croiser avec certaines autres et n'est donc pas intrinsèquement stérile. Ce phénomène est connu sous le terme d'**auto-incompatibilité.** Bien évidemment, les pois utilisés par Mendel n'étaient pas incompatibles puisqu'il réussit facilement à les autopolliniser. Nous savons à présent que l'incompatibilité a une base génétique et que des systèmes génétiques différents sont impliqués dans l'auto-incompatibilité de diverses espèces. Ces systèmes constituent de très beaux exemples d'allélisme multiple.

L'un des systèmes d'incompatibilité les plus communs est représenté chez le cerisier, le tabac, le pétunia et les primevères. Chez chacune de ces espèces, un seul gène, *S*, détermine les relations de compatibilité - incompatibilité; chez chacune de ces espèces, différentes plantes comportent différentes combinaisons par paires des très nombreux allèles différents de ce gène. La figure 4-6 montre comment ce système est à même de produire un cas d'incompatibilité totale, de semi-incompatibilité et de compatibilité complète. Si un grain de pollen porte un allèle *S* aussi représenté chez le parent maternel, il ne se développera pas.

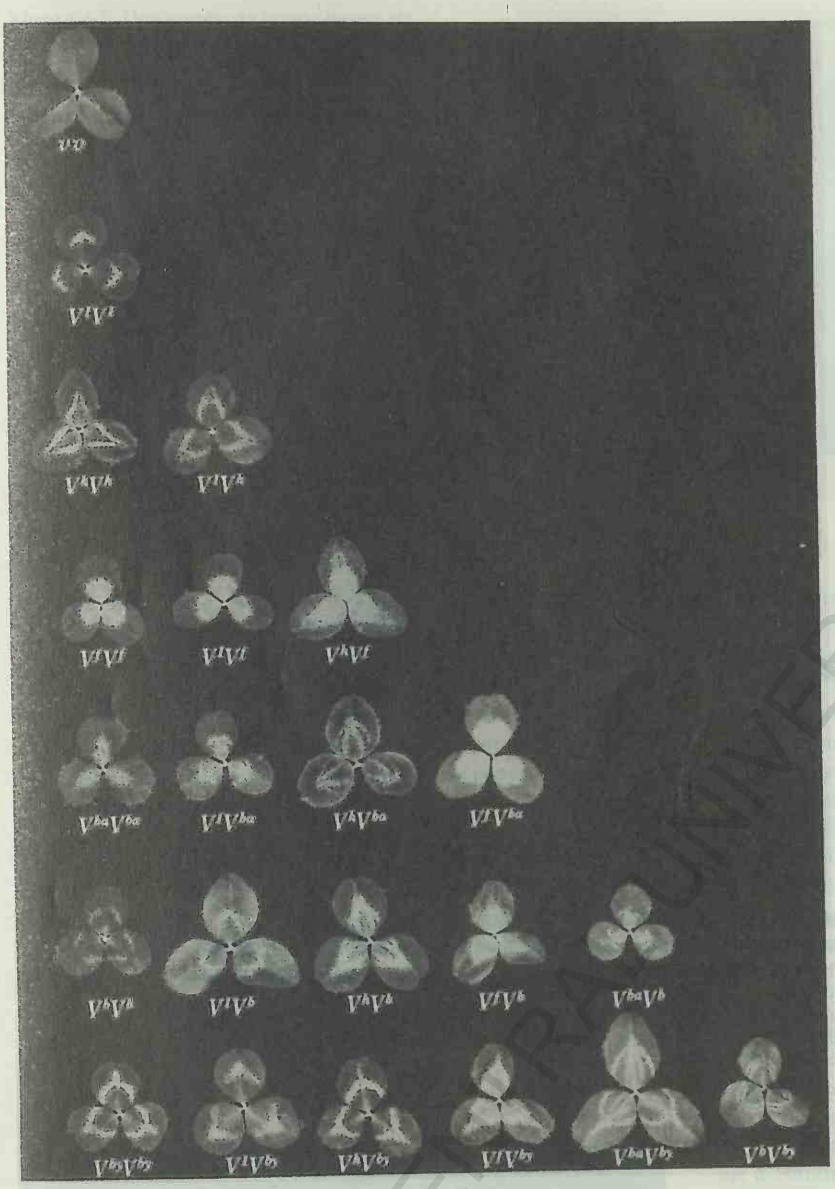


Figure 4-5. Des allèles multiples déterminent le type de chevrons sur les folioles du trèfle blanc. Le génotype est indiqué en dessous de chaque plante. (W. Ellis Davies.)

Cependant si cet allèle n'est pas représenté dans les tissus maternels, un tube pollinique contenant le noyau mâle sera produit et ce tube assurera la fertilisation. Le nombre d'allèles *S* d'une série chez une espèce peut être considérable (plus de 50 chez la primevère et le trèfle) et des cas où le nombre de ces allèles dépasse la centaine ont été mentionnés chez certaines espèces. Le développement d'un tel système favoriserait la fécondation croisée.

Puisque nous savons qu'un gène est un segment d'ADN chromosomique nous pouvons nous demander à quoi correspondent les allèles au niveau de l'ADN. Toute altération dans la séquence de l'ADN du gène sauvage se traduira par un nouvel allèle (une nouvelle forme du gène). Certaines de ces altérations pourraient entraîner une modification ou l'absence de la fonction exercée par la protéine codée par ce gène, et parmi celles-ci certaines seront identifiées comme allèles du fait qu'elles déterminent un phénotype distinct. Donc, en raison des nombreux types de modification de l'ADN d'un gène, le nombre d'allèles possibles est très grand mais le nombre de phénotypes nouveaux dus à ces changements l'est nettement moins.

Message Un gène peut se présenter sous différents états ou formes — une situation appelée allélisme multiple. Les allèles sont considérés comme faisant partie d'une série et les membres de cette série peuvent présenter tous les types de dominance entre eux.

Gènes létaux

Normalement, des souris sauvages présentent un pelage d'une pigmentation assez sombre. En 1904, Lucien Cuénot étudia des souris au pelage d'une couleur plus claire dénommée jaune. Suite au croisement d'une souris jaune avec une souris normale provenant d'une lignée pure, Cuénot observa dans la descendance un rapport 1 : 1. Cette observation suggère qu'un seul gène détermine

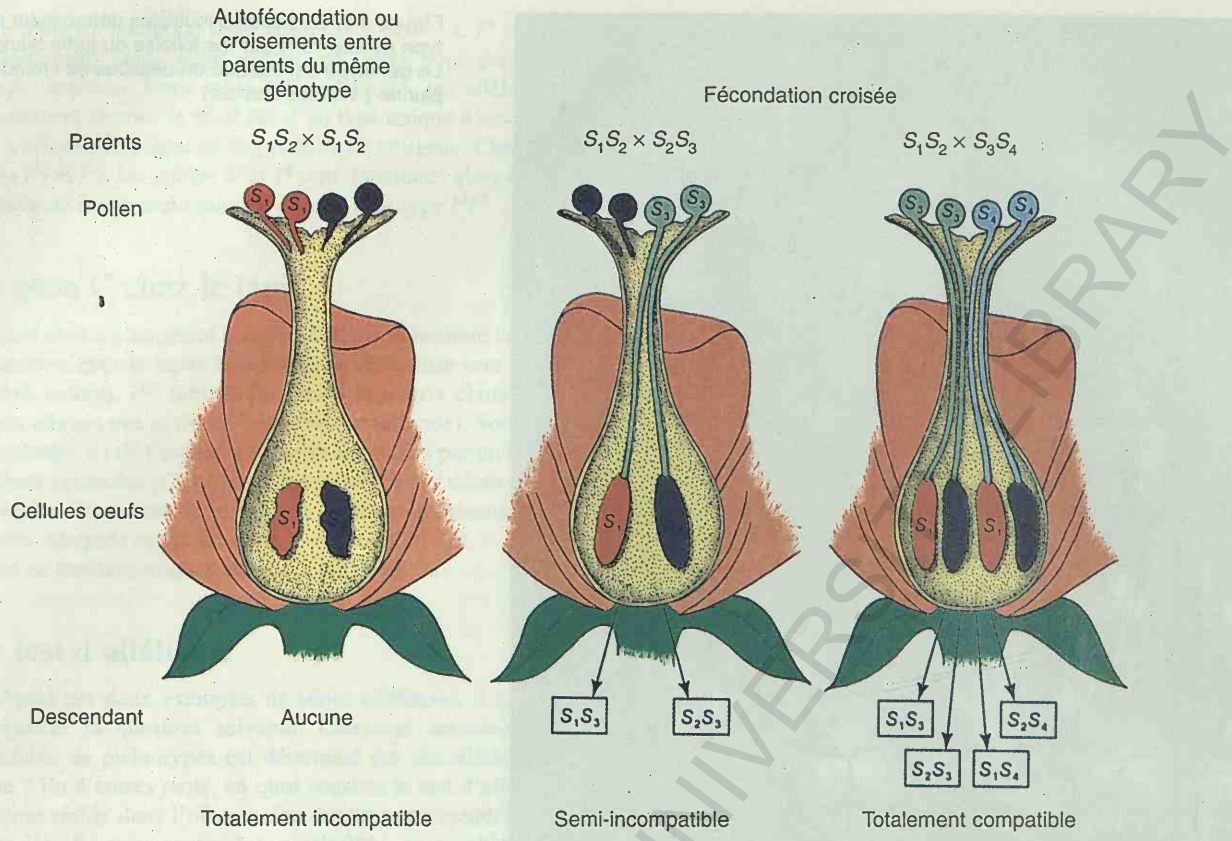


Figure 4-6. Diagramme illustrant le contrôle de l'incompatibilité par des allèles multiples chez certaines plantes. Un tube pollinique ne se développera pas si l'allèle *S* qu'il contient est aussi présent chez le parent femelle. Ce diagramme illustre un cas à quatre allèles, mais de nombreux systèmes d'incompatibilité comportent un nombre nettement plus élevé d'allèles. De tels systèmes conduisent à stimuler l'échange de gènes entre lignées de plantes en rendant l'autofécondation impossible et les croisements entre types apparentés très peu probables. (Extrait de A.M. Srb, R.D. Owen et R.S. Edgar, *General Genetics,* 2d ed., Copyright © 1965, W.H. Freeman and Company.)

la couleur du pelage et que l'allèle jaune est dominant sur l'allèle déterminant la couleur normale. Cependant, la situation devint plus confuse lorsque Cuénot croisa les souris jaunes entre elles. Le résultat obtenu fut toujours le même quelles que soient les souris jaunes utilisées.

jaunes × jaunes → $\frac{2}{3}$ jaunes ; $\frac{1}{3}$ couleur normale

Deux aspects de ces résultats sont intéressants. Premièrement, le rapport 2 : 1 se démarque du rapport mendélien attendu. Deuxièmement, aucune descendance jaune homozygote ne fut jamais obtenue suite au croisement jaune x jaune.

Cuénot suggéra l'interprétation suivante de ses résultats. Un croisement entre deux hétérozygotes devrait conduire à un rapport génotypique mendélien de type 1 : 2 : 1. Si l'une des classes homozygotes mourait avant la naissance, les nouveaux-nés montreraient un rapport 2 : 1 entre hétérozygotes et homozygotes survivants. En d'autres termes, l'allèle A^Y pour le jaune est dominant vis-à-vis de l'allèle normal A en ce qui concerne son effet sur la coloration, mais se comporte aussi comme un allèle **récessif létal** par rapport au caractère que nous pourrions appeler **viabilité.** . Donc, une souris à génotype homozygote A^YA^Y meurt avant la naissance et ne s'observe pas dans la descendance. Toutes les souris jaunes survivantes doivent être hétérozygotes A^YA de telle sorte que le croisement entre souris jaunes fournira toujours les résultats suivants.

$A^YA \times A^YA$ →
- $\frac{1}{4}$ AA de couleur normale
- $\frac{2}{4}$ A^YA de couleur jaune
- $\frac{1}{4}$ A^YA^Y mourant avant terme.

Le rapport mendélien attendu de 1 : 2 : 1 serait observé au niveau des zygotes, mais se modifie en un rapport 2 : 1 au sein des descendants viables suite à la létalité des génotypes A^YA^Y. Cette

Figure 4-7. Une portée de souris issues de deux parents hétérozygotes pour l'allèle «pelage coloré», qui est létal à double dose. Les souris les plus grosses sont les parents. Toute la descendance n'est pas montrée. (Anthony Griffiths)

hypothèse fut confirmée par le prélèvement d'utérus de femelles gravides après un croisement jaune x jaune : un quart des embryons furent effectivement trouvés morts. La figure 4-7 montre une portée type d'un croisement entre souris jaunes.

L'allèle A^Y exerce ses effets sur deux caractères : la coloration du pelage et la survie. De tels gènes, connus pour avoir des effets phénotypiques distincts sont dénommés **pléiotropes.** Il est tout à fait possible que les deux effets de l'allèle pléiotrope A^Y soient le résultat d'une même cause, qui entraîne la couleur jaune à simple dose et la mort à double dose.

Chez le chat le phénotype dit de Manx (Figure 4-8) est dépourvu de queue et est dû à un allèle létal à l'état homozygote. Une seule copie de l'allèle Manx, M^L, perturbe sérieusement le développement spinal normal, produisant l'absence de queue chez l'hétérozygote M^LM. Chez les homozygotes M^LM^L, les deux doses du gène conduisent à de telles anomalies du développment que l'embron ne survit pas.

Figure 4-8. Chat de Man. Tous les chats de ce type sont hétérozygotes pour un allèle dominant déterminant l'absence de queue. L'allèle est létal à l'état homozygote. Les yeux dissemblables ne sont pas associés à l'absence de queue. (Gérard Lacz/NHPA).

Il a y de nombreux types d'allèles létaux. Certains d'entre eux conduisent à un phénotype identifiable à l'état hétérozygote, comme c'est le cas pour la souris jaune et le chat Manx. Certains allèles létaux complètement dominant entraînent la mort en simple dose chez l'hétérozygote. Certains n'entraînent aucun effet décelable chez l'hétérozygote et la létalité est totalement récessive. En outre, des allèles létaux peuvent s'exprimer de manière différente selon le stade de développement. Ceci est très bien illustré chez l'homme. Il a été estimé que chaque génome humain comporte un petit nombre de recessifs létaux. L'effet de létalité s'exprime chez les descendants homozygotes issus d'un marriage entre deux personnes porteuses du même récessif létal sous forme hétérozygote. Certains létaux entraînent la mort du foetus et sont soit non-identifiés ou classés comme avortements spontanés. D'autres encore, comme ceux responsable de la dystrophie musculaire Duchenne, de la phénylcétonurie ou de la mucoviscidose, s'extériorisent au cours de l'enfance. L'époque de la mort peut être l'âge adulte, comme dans le cas de la maladie d'Huntington. La somme de tous les gènes létaux et délétères présents chez les individus est appelée le fardeau génétique, que chaque population doit supporter.

Comment ces gènes léthaux agissent-ils ? Dans certains cas, il est possible de tracer la suite des événements conduisant à la mort. Une situation assez banale est due au fait que l'allèle entraîne la déficience d'une réaction chimique essentielle. La phénylcétonurie chez l'homme est un bon exemple d'une telle déficience. Dans d'autres cas, il s'agit d'un défaut dans la structure de l'individu. Par exemple, chez le rat, un allèle létal cause un cartilage anormal et l'effet de cette anomalie se répercute dans plusieurs organes différents entraînant des symptomes de létalité, comme montré à la figure 4-9. L'anémie à cellules falciformes en est un autre exemple.

La létalité d'un gène peut aussi souvent dépendre du milieu dans lequel l'organisme se développe. Tandis que certains allèles seraient létaux virtuellement dans tous les environnements, d'autres sont viables dans un environnement donné mais létaux dans un autre. Par exemple, rappelez-vous que de nombreux phénotypes sélectionnés par les agriculteurs auraient certainement été éliminés dans la nature suite à leur compétition avec les individus normaux de la population. Les variétés de céréales modernes en

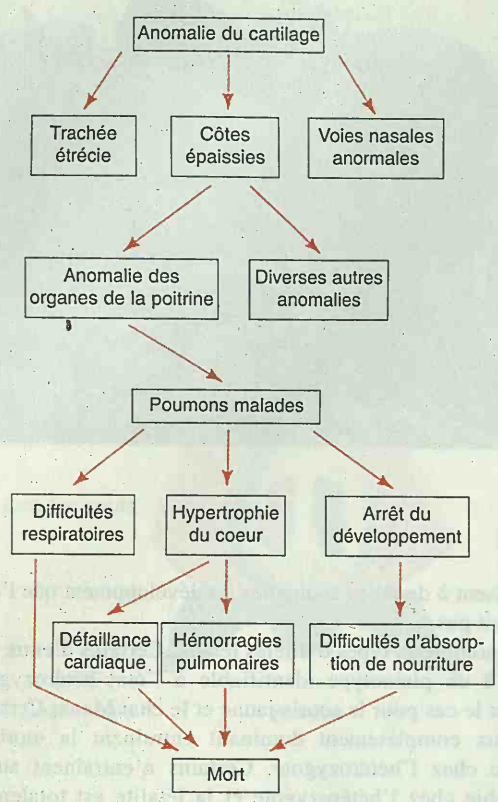


Figure 4-9. Diagramme illustrant comment un gène létal déterminé entraîne la mort chez le rat (Extrait de I.M. Lerner et W.J. Libby, *Heredity, Evolution and Society,* 2ème ed. chez W.H. Freeman and Company ;1976, d'après H. Grüneberg.)

donnent aussi de bons exemples ; seuls les soins attentifs du cultivateur ont réussi à maintenir de tels phénotypes pour notre bénéfice.

Dans la pratique, nous rencontrons couramment des situations où les rapports mendéliens attendus sont biaisés suite à la viabilité réduite d'un allèle. Par exemple, dans le croisement *Aa* x *aa,* nous prédisons dans la descendance un rapport phénotypique de 50 pour cent de *A* - et de 50 pour cent de *aa,* mais nous pourrions observer en fait un rapport du type 55 % : 45 % ou 60 % : 40 %. Dans ce cas, l'allèle *a* est dit *subvital*, ou *semi-létal*, puisque la létalité ne s'exprime que chez quelques individus. Cette létalité partielle peut varier de 0 à 100 pour cent, selon le reste du génome et le milieu. Ce point sera reconsidéré plus tard.

Plusieurs gènes affectant le même caractère

Nous avons vu précédemment que lors d'une dissection génétique, l'identification d'un gène majeur associé à un caractère ne signifie pas que ce *seul* gène affecte le caractère. Un organisme est une machinerie compliquée au sein de laquelle toutes les fonctions interagissent plus ou moins. Les gènes eux-mêmes peuvent être considérés comme interagissant . Un gène ne fonctionne pas isolément; ses effets ne dépendent pas seulement de ses fonctions propres mais aussi des fonctions d'autres gènes (et aussi de son environnement). Dans de nombreux cas, ces interactions complexes entre gènes majeurs ont pu être décelées par l'analyse génétique et nous en considérons maintenant quelques exemples. Le mode d'interaction se révèle typiquement par des **rapports mendéliens modifiés.**

La couleur du pelage chez les mammifères

Les études la couleur du pelage chez les mammifères ont montré magnifiquement comment différents gènes coopèrent dans la détermination d'un caractère. La souris est un excellent mammifère pour des études de génétique en raison de sa petite taille qui la rend facile à maintenir dans un laboratoire , et de son cycle de reproduction court; c'est le mammifère le mieux étudié en ce qui concerne les bases génétiques de la couleur du pelage. La détermination génétique de la couleur du pelage chez d'autres mammifères est très semblable à celle de la souris qui peut donc être considérée comme un système modèle. Au moins cinq gènes majeurs interagissent dans la détermination de la couleur du pelage de la souris : *A, B, C, D* et *S.*

Le gène A. Ce gène contrôle la distribution des pigments dans le poil. L'allèle sauvage A détermine un phénotype dit agouti. Agouti désigne un gris moucheté d'aspect «poivre et sel». C'est là une couleur répandue chez les mammifères sauvages. L'effet est dû à une bande jaune sur le fond sombre de la gaine du poil. Chez le phénotype non-agouti (dû à l'allèle *a*), la bande jaune est absente, de telle sorte que la couleur du pelage est uniformément sombre (figure 4-10).

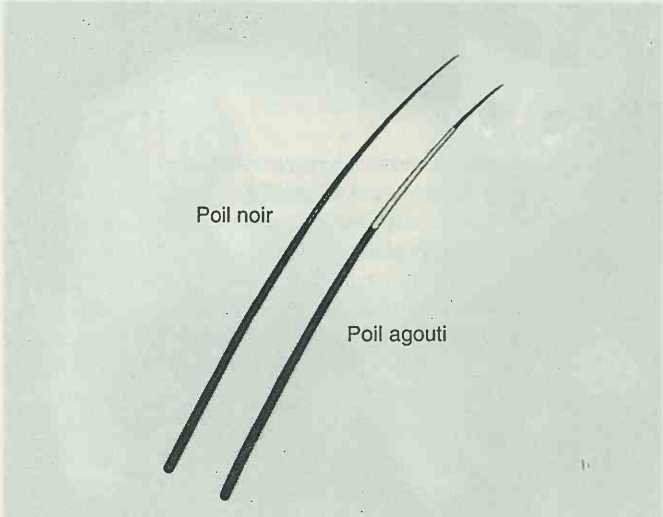


Figure 4-10. Poils d'une souris agouti (type sauvage) et d'une souris noire. La bande jaune sur chaque poil provoque chez le type agouti la coloration «poivre et sel».

L'allèle létal A^Y (discuté dans la section précédente) représente une autre forme de ce gène; il rend jaune l'ensemble de la gaine. Un autre allèle a^t produit un effet noir et feu, le dos est noir et le ventre jaune. Ces deux allèles ne seront pas inclus dans la suite de la discussion.

Le gène B. Ce gène contrôle la couleur du pigment. Il y a deux allèles majeurs du gène *B*. L'allèle *B* confère la couleur agouti en combinaison avec *A*, mais un noir uniforme avec *aa*. Le génotype *A - bb* produit une couleur dite cannelle (brun souris) et *aabb* un brun uniforme.

Le croisement suivant illustre le mode d'hérédité des gènes *A* et *B* :

AA bb (cannelle) × *aa BB* (noir)
ou *AA BB* (agouti) × *aa bb* (brun)
↓
F_1 tous *Aa Bb* (agouti)

AaBb (agouti) × *AaBb* (agouti)
↓
F_2 9 *A – B –* (agouti)
3 *A – bb* (cannelle)
3 *aa B –* (noir)
1 *aa bb* (brun)

Chez le cheval, aucun gène agouti ne semble avoir survécu aux générations d'élevage, quoiqu'un tel gène existe chez des espèces sauvages apparentées au cheval. La couleur désignée comme brune chez la souris se dénomme alezan chez le cheval où ce phénotype est aussi récessif par rapport au noir.

Le gène C. L'allèle sauvage *C* permet l'expression de la coloration tandis que l'allèle *c* l'empêche. La combinaison *cc* est dite **épistatique** par rapport aux autres gènes déterminant la couleur. Le terme épistatique signifie littéralement «se superposant à ; en situation homozygote, l'allèle *c* efface l'expression d'autres gènes de coloration du pelage. Les animaux *cc*, dépourvus de pigmentation, sont dits albinos. Les albinos sont courants chez de nombreuses espèces de mammifères mais peu représentés chez les oiseaux, serpents, poissons (figure 4-11) et chez l'homme (chapitre 2). Nous avons déjà appris que l'allèle c^h (himalayen) chez le lapin détermine un pelage de couleur sombre seulement aux extrémités. Cet allèle existe aussi chez d'autres mammifères, dont la souris, et est dénommé himalayen, ou siamois chez le chat (figure 4-12). L'allèle *ch* est considéré comme une version sensible à la chaleur de l'allèle C. Ce n'est qu'aux extrémités plus froides du corps que *ch* est fonctionnel et peut former un pigment. Au niveau des parties chaudes du corps il se comporte exactement comme l'allèle albinos *c*.

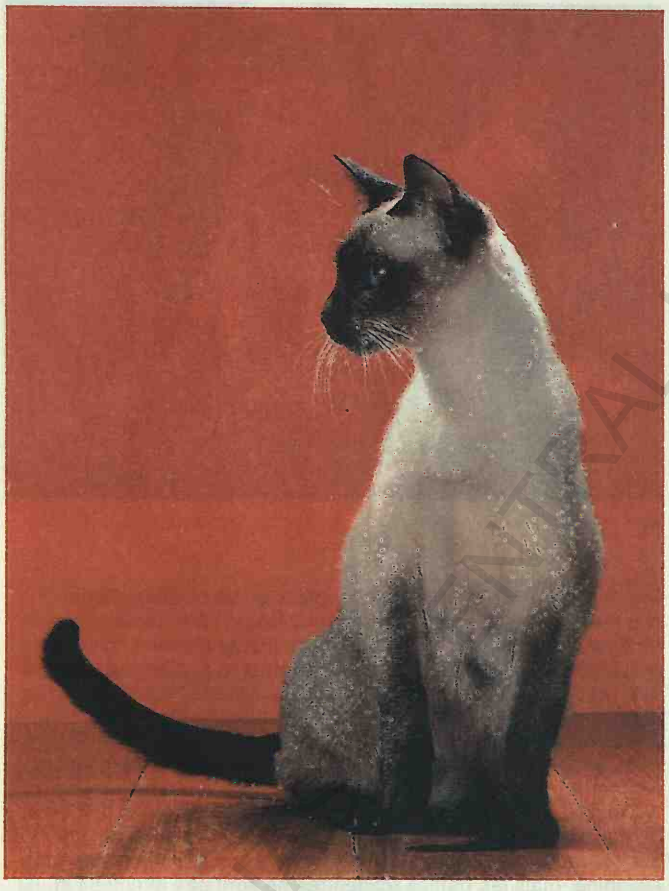
(a)

(b)

Figure 4-11. Albinisme chez les reptiles et les oiseaux. Dans chaque cas, le phénotype est le produit d'un allèle récessif qui rend impossible la production de mélanine, le pigment noir des cellules de la peau. (L'allèle normal permet la synthèse de mélanine). (a) Serpent à sonnettes. Chez cette espèce, la coloration normale sombre est due uniquement à la mélanine, de telle sorte que l'allèle abinos entraîne un aspect totalement dépigmenté (K.H.Switak/NHPA) (b) Pingouin. Chez cette espèce, la mélanine confère normalement à la plupart des plumes du corps une couleur noire, mais la couleur rouge-orange des plumes de la tête et du bec est due à un autre pigment chimiquement sans relation avec la mélanine. L'allèle récessif albinos entraîne l'absence de mélanine, mais les parties rougeâtres ne sont pas affectées et conservent leur couleur normale (A.N.T./NHPA).

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI BIOLOGIE
B.C.U.

(a)



(b)

Figure 4-12. Les allèles sensibles à la température du gène C produisent des phénotypes semblables chez plusieurs mammifères. Ces allèles entraînent une réduction marquée ou même l'absence de mélanine (pigment noir) dans les zones de la peau recouvrant les parties les plus chaudes du corps. Là où la température est la moins élevée comme au niveau des extrémités du corps, la mélanine est synthétisée, ce qui donne lieu à un museau, des oreilles, une queue ou des pattes plus sombres. (a) souris himalayenne (Anthony Griffiths) (b) chat siamois (Walter Chandoha). En outre, des lapins himalayens (non-représentés) sont souvent vendus comme animaux domestiques. Tous trois sont de génotype $c^h c^h$.

Des gènes épistatiques produisent des rapports modifiés intéressants, comme dans le cas du croisement suivant (dans lequel nous supposons que les deux parents sont *aa*).

BB cc (albinos) × *bb CC* (brun)
ou *BB CC* (noir) × *bb cc* (albinos)

↓

F_1 tous *Bb Cc* (noir)

Bb Cc (noir) × *Bb Cc* (noir)

↓

F_2	9 *B – C –* (noir)	9
	3 *bb C –* (brun)	3
	3 *B – cc* (albinos)	4
	1 *bb cc* (albinos)	

Le rapport phénotypique 9 : 3 : 4 est révélateur d'un type d'interaction entre gènes appelé *épistasie récessive*. Ce cas d'épistasie récessive est bien illustré par l'exemple des trois couleurs familières présentées par les chiens Labrador. Les trois couleurs, noire, chocolat et dorée (figure 4-13) sont le résultat de l'action de divers gènes. Les allèles *B* et *b*, semblable à ceux décrits pour la souris donnent lieu respectivement à la couleur noire et brun chocolat. Pour un autre gène, l'homozygote *ee* est epistatique par rapport à la fois à *B-* et *bb* et donne lieu à une couleur dorée. Il en résulte que pour être noir ou brun, un chien doit posséder l'allèle *E*. L'on peut parfois déduire si un chien doré est *B-* ou *bb* à la couleur du nez et des lèvres parce que le caractère épistatique de *ee* se marque surtout au niveau du pelage et constitue un exemple d'expression génique spécifique à un tissu.

Il faut noter ici que le terme *épistasie* est souvent utilisé d'une autre façon (principalement en génétique des populations) pour désigner *tout* type d'interaction entre gènes, mais ici nous restreignons son usage à la signification spécifique que nous venons de décrire.

Message Un allèle épistatique d'un gène donné abolit l'expression des phénotypes possibles dus à un autre gène et à sa place impose son propre phénotype.

Le phénomène d'épistasie n'est en rien mystérieux en dépit des rapports F_2 inhabituels. L'exemple d'épistasie illustré par la couleur du pelage chez la souris prend tout son sens si nous considérons l'allèle *C* comme nécessaire à la synthèse des pigments, et les allèles *B* et *b* comme déterminant ce que sera la couleur du pigment, à savoir noir pour *B* et brun pour *b*. Si *c* est vu comme une forme inactive de *C*, le mécanisme de l'épistasie devient clair, puisque, si aucun pigment n'est synthétisé, peu importe que le facteur déterminant la couleur noire ou brune soit présent.Un manque de pigmentation ou *blancheur* en résulte. Les pigments absorbent et réfléchissent des longueurs d'ondre spécifique du spectre visible, tandis qu'en l'absence de pigment il n'y pas d'absorption spécifique et toute la lumière est réfléchie. La séquence de réactions suivantes peut être envisagée :

CUNY CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(a) (b) (c)

Figure 4-13. Hérédité de la couleur de la robe chez les Labrador retrievers. Deux allèles, *B* et *b*, d'un gène de pigment déterminent respectivement les couleurs noire (a) ou brune (b) de la robe. A un gène non-lié, l'allèle *E* permet l'accumulation de la coloration dans la robe tandis que *ee* l'empêche et provoque le phénotype doré (c). Ceci est un cas d'épistasie récessive. Les trois génotypes homozygotes phénotypiquement différents sont *BBEE* (a), *bbEE* (b) et *BBee* ou *bbee* (c). Le chien (c) est probablement *BBee* - l'animal possède encore la capacité de produire le pigment noir, ainsi qu'en témoignent son nez et ses lèvres noires, mais ne peut pas l'accumuler dans les poils. La descendance d'un croisement dihybride donnerait un rapport de 9(noir):3(brun):4(doré). (Anthony Griffiths)

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

pas de pigment $\xrightarrow{\text{allèle C}}$ précurseur du pigment $\xrightarrow{\text{allèle B}}$ pigment noir

précurseur du pigment $\xrightarrow{\text{allèle b}}$ pigment brun

En général, chaque fois qu'un gène se trouve situé en amont dans la chaîne génétique de commande, nous pouvons nous attendre à un effet épistatique de l'allèle inactif sur les gènes situés plus en aval dans la hiérarchie. De ce fait la reconnaissance d'un cas d'épistasie (comme révélé par le rapport mendelien modifié) peut suggérer au chercheur des hypothèses sur la séquence d'action des gènes. Ce principe peut être utile si l'on veut associer des voies de développement.

Message Les allèles épistatiques agissent généralement avant les gènes qu'ils oblitèrent au sein d'une séquence biochimique ou de développement.

Le gène D. Le gène *D* contrôle l'intensité de la pigmentation due aux autres gènes de couleur du pelage. Les génotypes *DD* et *Dd* permettent pleinement l'expression de la couleur chez la souris, mais *dd* «dilue» le pigment, ce qui se traduit par une teinte laiteuse. L'effet résulte d'une distribution inégale du pigment dans la gaine du poil. Des pelages agouti clair, cannelle clair, brun clair ou noir léger ont tous été observés. Un gène de ce type est appelé un **gène modificateur.** Dans l'exemple de croisement suivant, nous présumons que les deux parents sont *aa CC*.

BB dd (noir dilué) × *bb DD* (brun)
ou *BB DD* (noir) × *bb dd* (brun dilué)

↓

F_1 tous *Bb Dd* (noir)

Bb Dd (noir) × *Bb Dd* (noir)

↓

F_2
9 *B – D –* (noir)
3 *B – dd* (noir dilué)
3 *bb D –* (brun)
1 *bb dd* (brun dilué)

Chez le cheval, l'allèle *D* présente une dominance incomplète. La figure 4-14 montre comment les gènes de dilution affectent la pigmentation des chevaux alezan et bai.

Le gène S. Le gène *S* contrôle la présence ou l'absence de taches. Le génotype *S-* ne présente pas de taches et *ss* produit une juxtaposition de taches appelée «pie» à la fois chez la souris et le cheval. Ce schéma peut se superposer à n'importe quelle couleur de pelage mentionnée préalablement, à l'exception évidemment du type albinos.

A ce point de notre discussion, il est évident que l'aspect du pelage normal chez la souris sauvage est produit par un jeu com-

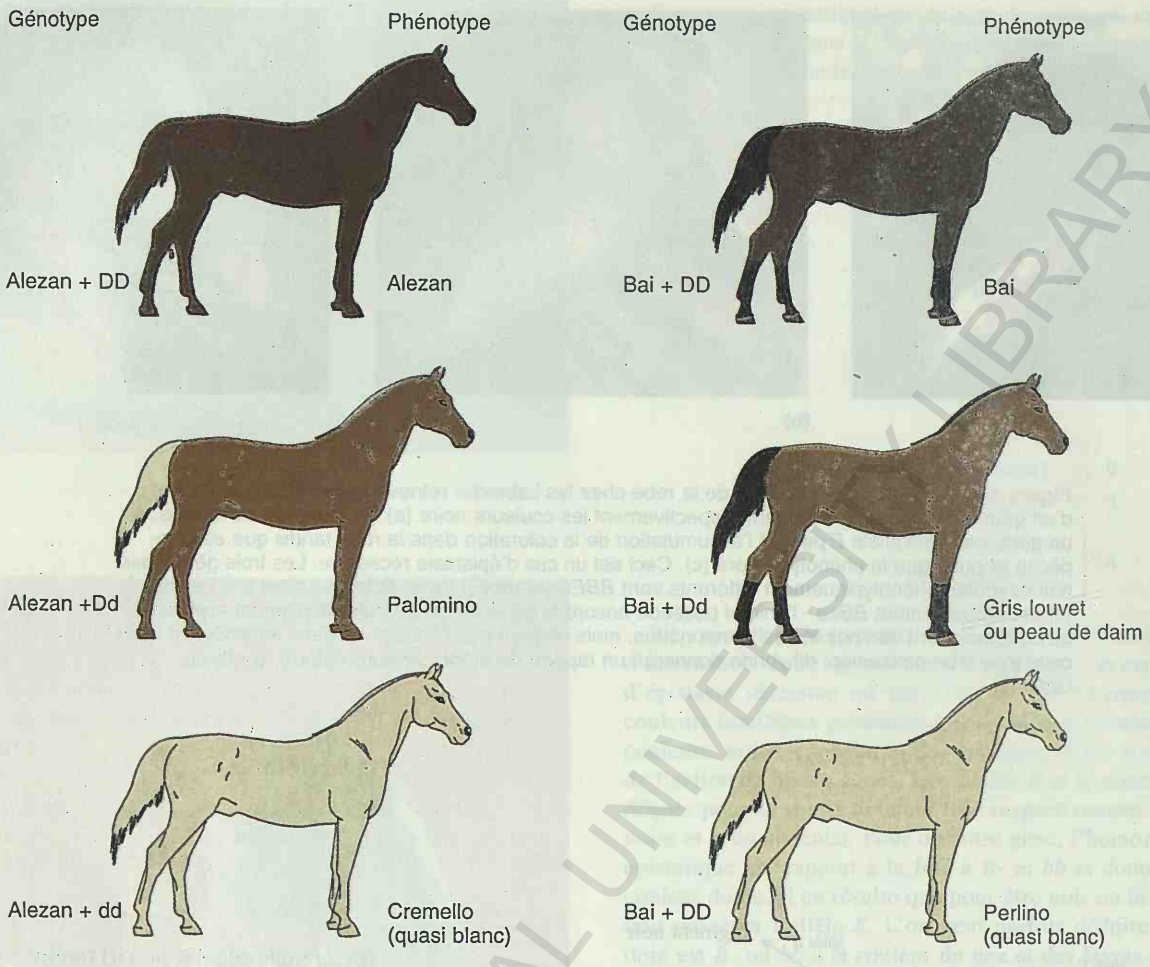
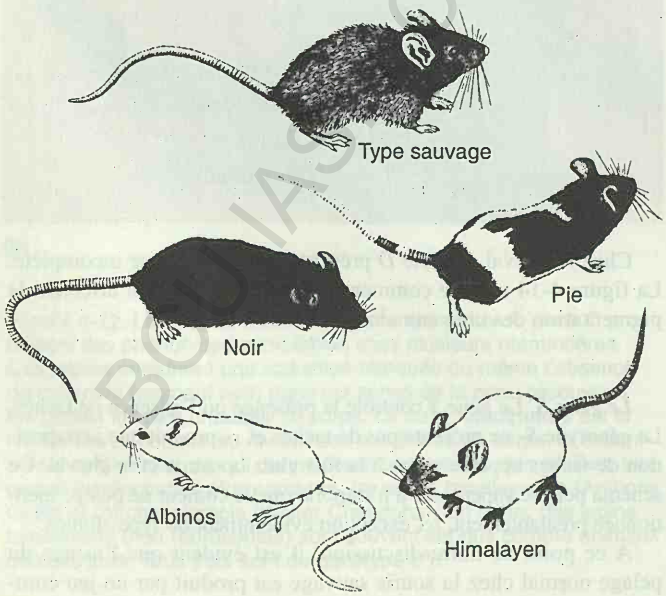


Figure 4-14. L'effet modificateur de gènes de dilution sur les génotypes alezan et bai chez le cheval. Notez la dominance incomplète de *D*. (Extrait de J.W. Evans et al., *The Horse*. chez W.H. Freeman and Company, 1977)



plexe d'interactions entre gènes déterminant le type de pigment, la répartition de ce pigment au niveau de chacun des poils, la répartition du pigment sur le corps de l'animal et la présence ou l'absence de pigments. Ces interactions se déduisent à partir de croisements chez lesquels deux gènes ou plus sont hétérozygotes pour des allèles modifiant la couleur normale du pelage. La figure 4-15 illustre quelques types de pigmentation chez la souris. De telles interactions entre gènes déterminent la plupart des caractères de tout organisme.

D'autres exemples d'interactions entre gènes.

D'autres organismes nous fournissent aussi des exemples instructifs d'interactions entre gènes. L'un des plus frappants

Figure 4-15. Quelques phénotypes du pelage chez la souris.

BOUVIAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

concerne l'hérédité de la couleur de la peau chez les couleuvres à gouttelettes (*Elaphe guttata*). Sa couleur naturelle lui servant de camouflage est orange et noire selon un motif répétitif (figure 4-16a).Ce phénotype est dû à deux pigments distincts, tous deux sous contrôle génétique. L'un des gènes produit le pigment orange et ses allèles sont *O* (présence de pigment orange) et *o* (absence de pigment orange). L'autre gène produit le pigment noir et ses allèles sont *B* (présence de pigment noir) ou *b* (absence du pigment noir). Le motif naturel est dû au génotype *O-B-*, un serpent de génotype *ooB-* est noir, et un serpent de génotype *O-bb* est orange (fig. 4-16c). Le double homozygote récessif *oobb* est albinos, comme le montre la figure. Notez que la couleur rose pâle de l'albinos est due à un autre pigment, l'hémoglobine du sang, visible sous la peau du serpent. Le phénotype albinos indique aussi clairement qu' outre le pigment un autre élément joue un rôle dans le phénotype, et ceci concerne la faÿon répétitive dont le pigment est localisé.

Puisque deux gènes sont en cause dans ce système, nous obtenons un cas typique d'hérédité dihybride et les quatre phénotypes se répartissent selon un rapport 9:3:3:1 en F_2. Il ne s'agit pas d'un rapport mendélien réellement modifié, mais il apparaît clairement que le caractère de la peau est dû à l'interaction de gènes. Une descendance typique pourrait être obtenue comme suit :

OObb (orange) × *ooBB* (noir)

↓

F_1 *OoBb* (couleur naturelle)

OoBb (naturel) × *OoBb* (naturel)

↓

F_2 9 *O – B –* (naturel)
3 *O – bb* (orange)
3 *ooB –* (noir)
1 *oobb* (albinos)

Le pois nous fournit un bon exemple d'un autre rapport modifié lié à une autre type d'interactions entre gènes. Lorsque deux lignées pures de pois, toutes deux à fleurs blanches, sont croisées, toutes les plantes F_1 présentent des fleurs pourpres. La F_2 renferme à la fois des plantes à fleurs pourpres et à fleurs blanches dans un rapport 9 : 7. Comment ces résultats peuvent-ils s'expliquer ? Au stade actuel, vous supposerez immédiatement que ce rapport 9 : 7 est en fait un 9 : 3 : 3 : 1 modifié. L'explication est que chez le pois, deux gènes différents ont des effets similaires sur la couleur des pétales. Représentons les allèles de ces gènes par W1, w1,W2, w2. Le croisement des deux lignées blanches et leurs générations successives peuvent être représentés comme suit :

variété blanche 1 × variété blanche 2

$w_1w_1\ W_2W_2 \times W1W1w_2w_2$

↓

F_1 Tous $W_1w_1W_2w_2$ (pourpre)

$W_1w_1W_2w_2$ (pourpre) × $W_1w_1W_2w_2$ (pourpre)

↓

F_2	9 $W_1 - W_2 -$ (pourpre)	9	
	3 $W_1 - w_2\ w_2$ (blanche)	}	7
	3 $w_1w_1\ W_2 -$ (blanche)	}	
	1 $w_1w_1\ w_2w_2$(blanche)	}	

Les résultats nous montrent que l'homozygotie de l'allèle récessif de chacun des gènes entraîne le dévelopent de pétales blancs. Une plante à phénotype pourpre doit posséder au moins un allèle dominant de chacun des deux gènes. Cet exemple illustre l' **effet complémentaire des gènes**, une dénomination qui décrit bien comment l'action combinée des deux allèles dominants de gènes différents produisent un phénotype spécifique : dans ce cas, un pigment pourpre.

Message L'action complémentaire de gènes aboutit à un phénotype de type sauvage lorsque deux génotypes donnant lieu chacun à des phénotypes récessifs sont associés dans la même cellule.

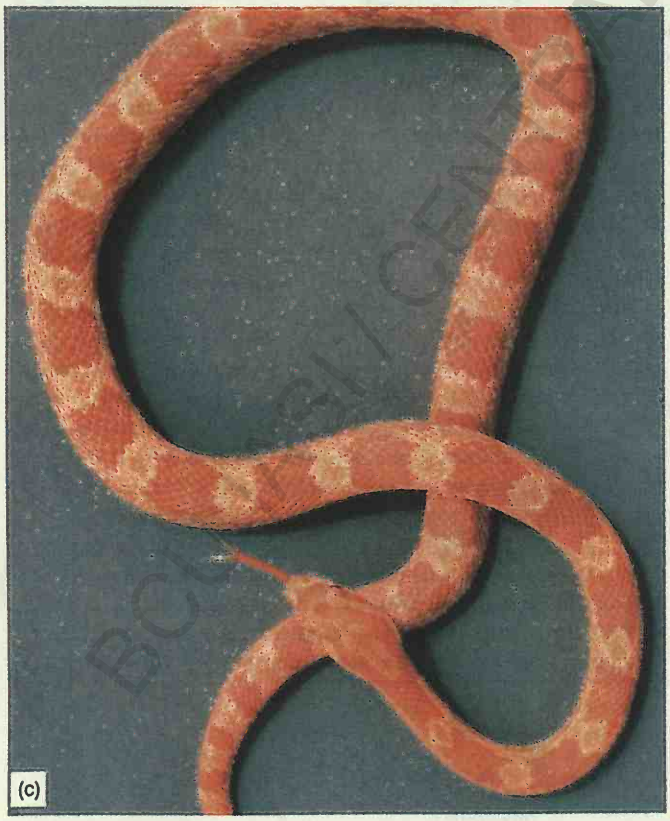
Les deux lignées pures de pois à fleurs blanches diffèrent, quoiqu'elles montrent le même phénotype. Les généticiens ont souvent affaire à des lignées d'origine indépendante caractérisées par le même phénotype. Généralement, de telles lignées repésentent des phénotypes récessifs anormaux issus du type sauvage. Les pois à fleurs blanches en sont un exemple : la plupart des espèces de pois dans la nature ont des pétales colorés, mais des phénotypes albinos apparaissent spontanément et sont presque toujours récessifs. Si deux ou davantage de ce type sont identifiées la question se pose immédiatement de savoir si elles représentent des variants différents dus à l'action d'allèles récessifs du même gène ou non. Le test de complémentarité nous fournit en fait un test opérationnel d'allélisme. Si les deux phénotypes récessifs sont croisés et qu'un phénotype sauvage s'observe en F_1, les génotypes parentaux sont complémentaires et les allèles récessifs doivent appartenir à des gènes différents. Par contre, qu'en serait-il si après croisement de deux récessifs albinos d'origine indépendante les F_1 et F_2 étaient toutes albinos ? Dans ce cas, on en déduirait à l'évidence que les déterminants récessifs sont des allèles d'un même gène.

Message Lorsque deux génotypes d'origine indépendante donnant lieu à des phénotypes récessifs semblables ne se complémentent pas, l'hypothèse retenue est que les déterminants génétiques des phénotypes sont des allèles du même gène.

LAVAL CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(a)

(b)


(c)

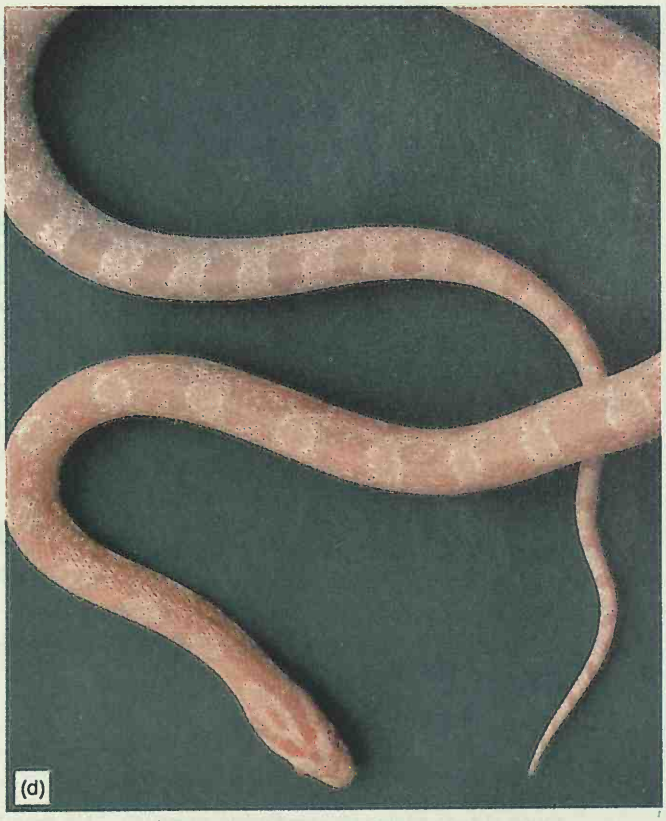

(d)

Figure 4-16. Analyse des gènes des pigments de la peau d'*Elaphe guttata*, une sorte de couleuvre. Le type sauvage (a) possède un profil de pigmentation comportant des pigments noirs et oranges. Le gène *O* détermine une enzyme impliquée dans la voie de synthèse du pigment orange: lorsque cette enzyme est déficiente (*oo*), aucun pigment orange n'est formé et la couleuvre est noire (b). Un autre gène, *B*, spécifie un enzyme responsable de la synthèse du pigment noir : si cette enzyme est déficiente (*bb*) la couleuvre est orange (c). Lorsque les deux enzymes font défaut la couleuvre est albinos (d). Les quatre génotypes homozygotes sont donc *OOBB* (a), *ooBB* (b), *OObb* (c) et *oobb* (d). Un croisement de a avec d ou de b avec c donnerait un dihybride F_1 sauvage et un rapport 9:3:3:1 pour les quatre phénotypes de la F_2. (Anthony Griffiths).

A présent, nous disposons de deux tests d'allélisme : tout d'abord, le rapport monohybride 3 :1 met en évidence un allèle dominant et un allèle récessif du même gène, et deuxièmement, l'absence de complémentation dans des croisements entre lignées d'origine indépendante indique que nous avons affaire à deux allèles récessifs du même gène.

Des variants génétiques chez la digitale pourpre (*Digitalis purpurea*) nous donnent d'excellents examples d'interactions géniques impliquées dans la morphologie générale de l'organisme. Trois gènes importants interagissent pour établir la couleur des pétales. Le premier entraîne la synthèse d'un pigment anthocyanique magenta. L'allèle *M* de ce gène assure la synthèse du pigment, tandis que *m* en est incapable et détermine des pétales blancs. La figure 4-17 présente les phénotypes que nous envisageons dans notre discussion. Le deuxième gène est un gène modificateur. Un allèle, *D*, stimule la synthèse de larges quantités d'anthocyanine (magenta sombre) , et *d* n'en produit qu'une faible quantité (magenta clair). Le troisième gène est impliqué dans la localisation du pigment. L'allèle *W* empêche la formation de pigments dans tout le pétale sauf en macules au niveau de la gorge du pétale, alors que l'allèle *w* conduit à la formation de taches réparties sur l' ensemble des pétales. Ces trois gènes contrôlent donc la capacité de synthèse de pigment, la quantité qui en est synthétisée et sa localisation dans des cellules spécifiques des pétales. Nous pourrions envisager une gamme de croisements dihybrides, voire trihybrides, mais nous ne considérerons qu'un seul cas, un croisement dihybride qui illustre un type de rapport F_2 modifié nontraité jusqu'à présent.

Envisageons le croisement entre les deux génotypes *MMDDww* et *MMddWW*. Le phénotype du premier est magenta sombre en raison de la présence du gène modificateur *D* et de sa capacité de former le pigment dans l'ensemble du pétale. Le second est blanc à macules rouges puisqu'en effet la plante est capable de synthétiser le pigment (grâce à l'allèle *M*) mais que l'allèle *W* empêche tout dépôt sauf au niveau des macules de la gorge. Considérons donc les types de descendance que nous pouvons établir, mais en éliminant l'allèle *M* qui est en effet homozygote chez tous les individus.

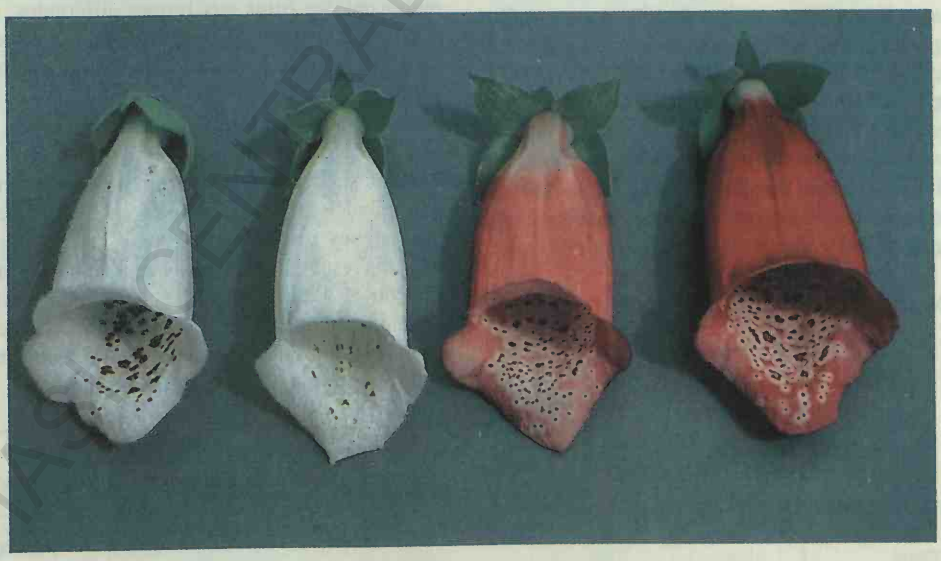


Figure 4-17. Phénotypes pigmentaires de la digitale, déterminés par trois gènes séparés. *M* code pour un enzyme qui synthétise l'anthocyane, le pigment rougeâtre qu'on voit dans ces pétales; *mm* ne produit pas de pigment et produit un phénotype albinos avec des taches jaunâtres. *D* est un activateur de l'anthocyane responsable de la formation d'un pigment plus foncé; *dd* a perdu cet effet activateur. Au troisième locus *ww* permet l'accumulation du pigment dans les pétales, mais W_1 l'empêche sauf dans les taches; il produit dès lors un phénotype blanc tacheté. Les quatre phénotypes sont donc, de gauche à droite, M-W- - - (blanc à macules magenta), mm- - - - (blanc à macules jaunâtres), M-wwdd (magenta clair) et M-wwD- (magenta sombre). (Anthony Griffiths).

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITAIRE

(MM)DDww × *(MM)ddWW*
(magenta sombre) (blanc à macules magenta)

↓

F1 *DdWw* (blanc à macules magenta)

DdWw × *DdWw*

(blanc à macules magenta) (blanc à macules magenta)

↓

F_2	9 *D – W –* (blanc à macules magenta)	12
	3 *ddW –* (blanc à macules magenta)	
	3 *D – ww* (magenta sombre)	3
	1 *ddww* (magenta clair)	1

Un rapport phénotypique 12 : 3: 1 est observé. Ce type d'interaction se nomme **epistasie dominante** car, comme le montre les données F_2, l'allèle dominant *W* supprime tant l'expression de *D* (magenta sombre) que de *d* (magenta clair) et les remplace par un autre phénotype, blanc à macules magenta.

Un autre type important d'interaction entre gènes est la **suppression.** Un suppresseur est un allèle qui empêche l'expression du phénotype d'un allèle d'un autre gène. Le terme suppresion est le plus souvent utilisé en rapport avec le renversement de l'effet d'un allèle anormal (une mutation; voir chapitre 7) conduisant à un phénotype normal (de type sauvage). Par exemple, considérons qu'un allèle *A* détermine le phénotype normal, tandis que l'allèle récessif *a* conduit à une anomalie. Un allèle récessif suppresseur s d'un autre gène fait en sorte que *a* s'exprime comme *A* de telle sorte que le génotype *aass* a un phénotype normal, semblable à A. Les allèles suppresseurs n'ont en général pas d'effet sur l'autre allèle du gène cible. Dans cet exemple, le phénotype *Aass* serait normal.

La présence de suppresseurs entraîne aussi des rapport mendéliens modifiés. Prenons le cas chez *Drosophila* d'un suppresseur récessif *su* de l'allèle récessif *pd* conférant à l'oeil la couleur pourpre. Une mouche homozygote aux yeux pourpres est croisée à une souche homozygote pour le suppresseur.

pDpDSuSu (pourpre) × *PdPdsusu* (rouge)

↓

F1 tous *PdpdSusu* (rouge)

PdpdSusu (rouge) × *PdpdSusu*(rouge)

↓

F_2	9 *Pd – Su –* (rouge)	13 rouges
	3 *Pd – susu* (rouge)	
	1 *pdpdsusu* (rouge)	
	3 *pdpdSu –* (pourpre)	3 pourpres

Le rapport global en F2 est de 13 rouges : 3 pourpres.

Le phénomène de suppression peut parfois se confondre avec celui d'épistasie. Cependant, puisque le suppresseur annule l'expression d'un allèle anormal et retablit le phénotype normal, le rapport mendélien en F2 modifié ne comporter que deux phénotypes (normal et anormal) alors que dans le cas d'épistasie l'allèle épistatique introduit un troisième phénotype dans le rapport.

Les rapports de ségrégation dus à la suppression peuvent préter à confusion parce que certains sont identiques à ceux provenant d'autres types d'interactions entre gènes. Les suppresseurs peuvent être dominants ou récessifs, et les allèles cibles correspondants peuvent être aussi dominants ou récessifs comme suit R –> R, D—>D, R—>D et D—>R, le suppresseur étant mentionné d'abord. Parmi ceux-ci, le premier (discuté en détail plus haut) et le second type conduisent tous deux à un même rapport F2, 13:3. Le troisième conduit à un rapport F2 9:7. Ce rapport semble le même que celui discuté précédemmant dans le cas d'allèles complémentaires. Cependant, s'il y a suppression, le rapport est de 9 mutants pour 7 sauvages alors que l'effet de complémentarité produit un rapport de 9 sauvages pour 7 mutants. Le dernier type d'interaction se caractérise par le même rapport que celui qui sera discuté au paragraphe suivant portant sur des gènes dupliqués. En effet la suppression D R n'est qu'une autre faÿon de considérer l'effet d'un gène dupliqué.

Message Les suppresseurs annulent l'expression de l'allèle anormal (mutant) d'un autre gène, ce qui se traduit par un phénotype normal.

Dans un autre type d'interactions intergéniques les gènes peuvent être représentés plus d'une fois dans le génome. L'exemple concerne des gènes contrôlant la forme du fruit chez la plante dite bourse à pasteur (*Capsella bursa-pastoris*). Deux lignées différentes ont des fruits aux formes différentes: arrondis chez l'une, allongés chez l'autre. Ces deux phénotypes sont-ils déterminés par deux allèles d'un seul gène ? Un croisement entre les deux lignées conduit à une F_1 à fruits arrondis ce qui reste compatible avec notre hypothèse d'une seule paire de gènes. Toutefois, la F_2 se caractérise par un rapport de fruits arrondis à fruits étroits de 15 : 1, ce qui suggère que nous avons affaire à une modification du rapport mendélien 9 : 3 : 3 : 1, pouvant s'expliquer par l'existence de deux **gènes dupliqués** (figure 4-18). Apparemment, des fruits arrondis résultent de la présence d'au moins un allèle dominant de l'un ou de l'autre gène. Ces deux gènes exercent une fonction identique. (Opposez ce rapport 15 : 1 à celui de 9 : 7 dû à des gènes complementaires où les *deux* gènes dominants sont nécessaires pour produire un phénotype spécifique).

Message Des gènes dupliqués introduisent une alternative dans la détermination génétique d'un phénotype spécifique.

Le tableau 4-3 fournit un résumé des différents types d'interactions entre gènes qui modifient les rapports mendeliens. Notez que nous n'avons envisagé que des rapports modifiés chez des organismes diploïdes. Des interactions de ce type peuvent être aussi décelées chez des organismes haploïdes. Nous avons déjà discuté le cas d'un gène chez le champignon *Neurospora* où un allèle, *al,* produit des spores asexuées albinos plutôt que de couleur orange due à l'allèle sauvage al^+ du même gène (voir Figure 3-37). Un croisement *al* x al^+ donne une moitié de descendants *al* et l'autre moitié al^+. Un autre gène, *ylo,* produit des spores asexuées jaunes

BCU LAUSANNE / CENTRE UNIVERSITAIRE

(Figure 3-37) tandisque l'allèle de type sauvage *ylo*$^+$ produit la couleur orange. Le croisement *ylo* x *ylo*$^+$ donne une moitié de descendants *ylo* et l'autre moitié *ylo*$^+$. Lorsqu'une culture *al* est croisée avec une culture *ylo,* la descendance produite comporte 1/4 de jaunes, 1/4 de type sauvage et 1/2 d'albinos. Comment expliquer ces résultats ? La réponse est que nous sommes en présence d'un phénomène d'épistasie : *al* et *ylo* sont des allèles de gènes distincts, dont chacun est nécessaire pour la synthèse du pigment rose. Il ssuffit d'écrire les génotypes du croisement pour mettre en évidence comment fonctionne l'epistasie :

Cultures parentales haploïdes	*al ylo*$^+$ (albinos) × *al*$^+$ *ylo* (jaune)		
	↓		
Diploïde transitoire	*al*$^+$ / *al ylo*$^+$ / *ylo*		
	↓ méiose		
Descendances (cultures obtenues à partir de spores sexuées)	$\frac{1}{4}$ *al ylo*	(albinos)	$\frac{1}{2}$
	$\frac{1}{4}$ *al ylo*$^+$	(albinos)	
	$\frac{1}{4}$ *al*$^+$ *ylo*	(jaune)	$\frac{1}{4}$
	$\frac{1}{4}$ *al*$^+$ *ylo*$^+$	(orange)	$\frac{1}{4}$

Les données suggèrent que *al*$^+$ et *ylo*$^+$sont tous deux nécessaires à la production de pigment rose et que soit *al* soit *ylo* bloque cette synthèse. Le mécanisme épistatique est mis en lumière par le phénotype albinos du génotype *al ylo*, qui rappelle un autre exemple d'»effet en amont» tel que celui décrit dans le cas de l'albinisme chez la souris. De notre analyse génétique, nous postulerons que *al*$^+$ est nécessaire à la synthèse de pigment et que les allèles de l'autre gène déterminent si le pigment est rose (*ylo*$^+$) ou jaune (*ylo*). Dans des chapitres ultérieurs nous verrons que les études chimiques confirment généralement cette interprétation issue de l'analyse génétique.

Les couleurs variés des poivrons que nous pouvons observer au marché (Figure 4-19) sont dues à des gènes qui combinent plusieurs de ces types d'interaction que nous venons de discuter. Les couleurs représentées dans la figure ne sont que quelques

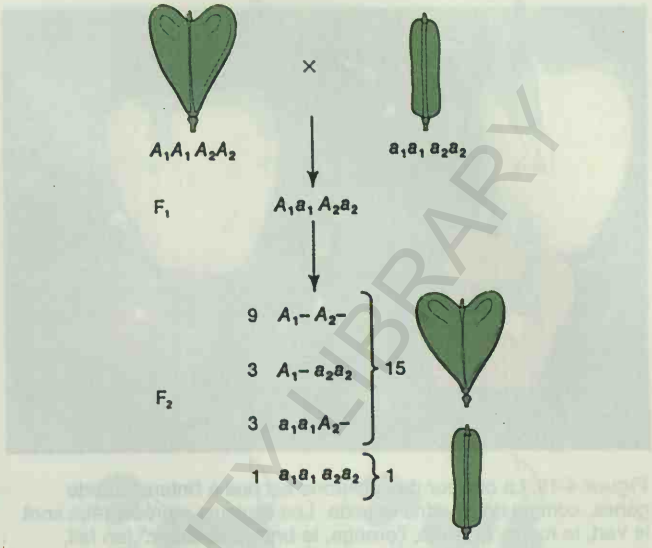


Figure 4-18. Mode de transmission de gènes dupliqués contrôlant la forme du fruit de la Bourse à pasteur. Tant A1 qu'A2 peuvent déterminer un fruit arrondi.

exemples d'un gamme disponible plus large. Le système génétique comprend 4 gènes en interaction. L'un des gènes contrôle la suppression du pigment chlorophyllien vert dans le fruit. Tous les types figurés sont verts au départ, mais un allèle dominant *Y* suscite la disparition de la chlorophylle, tandis qu'en présence de *y* la chlorophylle persiste. Lors de la maturation des poivrons, des pigments carotenoïdes sont synthétisés. Une paire d'allèles détermine le type de caroténoïde : *R* le type rouge et *r* le type jaune. Deux allèles récessifs de deux gènes différents *c1* et *c2*, ont une action similaire en ce sens qu'ils réduisent la quantité de caroténoïde synthétisée, ce qui se traduit par des nuances plus claires. Par exemple, chez un génotype *R*-, *c2* reduit la quantité de pigment rouge, produisant un organge brillant, ce qui n'est pas du à un pigment distinct mais à une moindre quantité de pigment rouge. Comme autre exemple, chez un phénotype *rr*, l'allèle *c2* agit sur le pigment jaune pour développer une teinte plus claire appelée *jaune citron* (non représentée dans la figure).

Tableau 4-3. Rapports phénotypiques modifiés suite aux interactions entre gènes.

Type d'interaction entre gènes	9 *A – B –*	3 *A – bb*	3 *aaB–*	1 *aabb*	Rapport phénotypique
Aucun (quatre phénotypes distincts)	9	3	3	1	9:3:3:1
Gènes complémentaires	9	7			9:7
Suppression dominante par *A* du gène *B* dominant	9	3	4		13:3
Epistasie récessive des gènes *aa* sur *B/b*	9	3	4		9:3:4
Epistasie dominante des gènes *A* sur *B/b*	12		3	1	12:3:1
Gènes dupliqués	15			1	15:1

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 4-19. La couleur des poivrons est due à l'interaction de gènes, comme décrit dans le texte. Les couleurs représentées sont le vert, le rouge, le jaune, l'orange, le brun et le "blanc" (en fait, jaune-vert très pâle) (Anthony Griffiths).

Les deux gènes *c* se comportent d'une certaine faÿon comme des gènes dupliqués en ce sens qu'ils entraînent des effets comparables. De la même faÿon vous pouvez constater que les gènes *c* agissent d'une faÿon similaire vis-à-vis des gènes de dilution de la couleur du pelage chez les mammifères. En outre, il est aussi intéressant de savoir que les effets de *c1* et de *c2* sont cumulatifs et que le génotype *c1c1c2c2* produit un niveau nettement plus réduit de carotène que si chaque allèle n'agissait que pour son compte. Les couleurs montrées à la figure 4-19 peuvent servir d'exemples de certaines des 16 combinaisons génotypiques possibles. En tant que génotypes homozygotes, le poivron vert est *rrc1c1c2c2yy* (chlorophylle présente, pas de caroténoide), le poivron rouge est *RRC1 C1 C2 C2YY*, le brun est *RRC1 C1 C2 C2yy* (combinaison du rouge et du vert), le jaune est *rrC1 C1 C2 C2YY*, l'orange est *RRC1 C1 c2 c2YY* , et le poivron "blanc" est *rrc1 c1 c2 c2YY*.

Cette discussion montre qu'un gène ne détermine pas un phénotype par sa seule action; il le fait conjointement avec d'autres gènes ainsi qu'en relation avec son environnement. Quoique les généticiens attribuent d'office un phénotype particulier à un allèle particulier, nous devons nous rappeler qu'il s'agit là d'une sorte de procédé facilitant l'analyse génétique. Cette convention provient de la capacité des généticiens à isoler les éléments individuels d'un processus biologique et de les étudier un par un par dissection génétique. Quoique que cette approche logique soit un aspect essentiel de la génétique, le message de ce chapitre est de mettre l'accent sur le fait que les gènes agissent de concert pour établir les caractéristiques globales d'un organisme.

Message Les différents types de rapports mendéliens dihybrides modifiés indiquent l'existence de différentes manières dans la faÿon qu'ont les gènes d'interagir entre eux pour déterminer le phénotype.

Pénétrance et expressivité

Dans les exemples précédents, la base génétique de la dépendance d'un gène vis-à-vis d'un autre a été démontrée. Dans d'autres cas, là où le phénotype attribué à un gène est reconnu comme dépendant d'autres facteurs dont la nature précise n'a pas été établie, les termes de *pénétrance* et d'*expressivité* peuvent être utiles pour décrire la situation.

Nous avons déjà rencontré le phénomène de pénétrance dans la discussion portant sur les allèles létaux. La **pénétrance** se définit comme le pourcentage des individus d'un génotype donné qui manifestent le phénotype normalement associé à ce génotype. Par exemple, un organisme peut avoir le génotype *aa* ou *A* - mais ne pas exprimer le phénotype qui y est normalement associé suite à la présence de modificateurs, de gènes épistatiques, ou de suppresseurs présents dans le reste du génome ou suite à un effet perturbateur du milieu. Le terme de pénétrance sert à décrire un tel effet quand la cause exacte en est inconnue.

Par ailleurs, l'**expressivité** décrit le degré d'expression phénotypique d'un génotype donné chez un individu. Des degrés variés d'expression chez des individus différents peuvent être le résultat de l'hétérogénéité de la constitution allélique du génome, ou de facteurs du milieu. La figure 4-20 illustre la distinction que l'on peut faire entre pénétrance et expressivité. Manifestement, tant la pénétrance que l'expressivité font partie intégrante du concept de norme de réaction discuté au chapitre 1.

L'analyse d'arbres généalogiques et les prévisions faites dans le cadre d'une guidancegénétique sont souvent contrariées par les phénomènes de pénétrance et d'expressivité. Par exemple, si un allèle responsable d'une maladie n'est pas complètement pénétrant (comme c'est souvent le cas) il est difficile d'établir un diagnostic génétique clair de la santé d'un individu membre d'une descen-

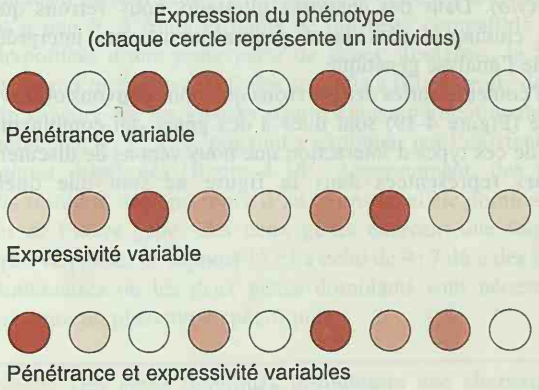


Figure 4-20. Diagramme représentant les effets de la pénétrance et de l'expressivité par le biais d'un caractère hypothétique, l'intensité pigmentaire. . Dans chaque rangée, tous les individus possèdent le même allèle (disons *P*) leur conférant à chacun le même «potentiel de production du pigment». Cependant, les effets du génome et du milieu peuvent supprimer ou modifier la production de pigments chez chaque individu.

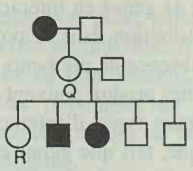


Figure 4-21. Manque de pénétrance illustré par un arbre généalogique dans le cas d'un gène dominant. L'individu Q doit posséder le gène (puisqu'il le transmet à sa descendance), mais il ne l'exprime pas phénotypiquement. Un individu tel que R ne peut pas être désigné à coup sûr comme possédant ou ne possédant pas le gène.

dance où la maladie se manifeste (par exemple, l'individu R de la figure 4-21). Par contre, l'analyse de descendances peut parfois identifier des individus qui n'expriment pas, mais possèdent certainement un génotype de malade (par exemple l'individu Q dans la figure 4-21).

Un exemple spécifique d'expressivité variable est fourni à la figure 4-22 et aussi à la figure 2-19 et dans le problème 11 du chapitre 2.

Message L'impact d'un gène au niveau phénotypique dépend non seulement de ses relations de dominance mais aussi de conditions liées au reste du génome et à son environnement.

En conclusion, retenez que les développements de l'analyse mendélienne exposés dans ce chapitre sont fondés principalement sur les complexités de l'expression des gènes. Les principes de Mendel concernaient les modes de transmission des gènes et nous apprenaient peu au sujet de leur expression. En additionnant les modes d'expression des gènes à leurs modes de transmission nous commençons à percevoir la trame de la génétique moderne.

Les développements de l'analyse mendélienne présentés dans ce chapitre et dans les suivants ne sont pas les seuls rencontrés lors de l'analyse génétique ; ils sont simplement les plus communs. Les critères permettant de reconnaître chaque phénomène — qu'il s'agisse d'allélisme multiple, de dominance incomplète, d'épistasie ou d'expressivité variable — se trouvent dans les résultats expérimentaux. L'expérimentateur doit être constamment à leur recherche, attentif à tout résultat pouvant indiquer le caractère exceptionnel d'une situation donnée. De tels signes conduisent souvent à la découverte de nouveaux phénomènes et ouvrent la voie à de nouvelles recherches.

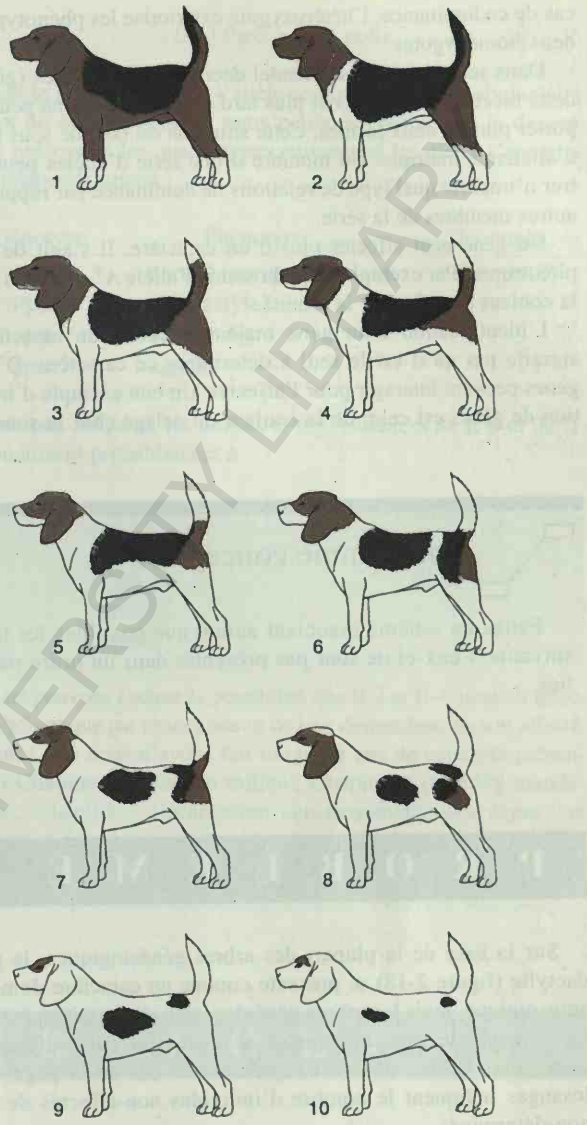


Figure 4-22. Expressivité variable illustrée par dix gradations dans la formation de taches pies chez le beagle. Chacun de ces chiens possède les gènes S^P de la robe pie. (D'après Clarence C. Little, *The Inheritance of Coat Color in Dogs*. Cornell University Press, 1957, et d'après Giorgio Schreiber, Journal of Heredity 9, 1930, 403).

RÉSUMÉ

Quoiqu'il ait été démontré que les lois de Mendel s'appliquent à tous les organismes eucaryotes, ces lois ne constituent qu'un point de départ dans la compréhension des bases de l'hérédité. Le vrai monde des gènes et des chromosomes est de loin plus complexe.

A la dominance complète observée par Mendel, nous avons ajouté des exemples de dominance incomplète et de codominance. En cas de dominance incomplète, le phénotype de l'hétérozygote est intermédiaire entre les phénotypes des homozygotes. Dans le

cas de codominance, l'hétérozygote extériorise les phénotypes des deux homozygotes.

Dans ses expériences, Mendel décrivit des particules (gènes) à deux facettes. On découvrit plus tard qu'en fait un gène peut comporter plus de deux formes. Cette situation est connue sous le nom d'allélisme multiple. Un membre d'une série d'allèles peut montrer n'importe quel type de relations de dominance par rapport aux autres membres de la série.

Un gène peut affecter plus d'un caractère. Il s'agit de gènes pléiotropes. Par exemple, chez la souris l'allèle A^Y affecte à la fois la couleur du pelage et la létalité.

L'identification d'un gène majeur affectant un caractère ne signifie pas qu'il est le seul à déterminer ce caractère. D'autres gènes peuvent interagir pour l'affecter. Un bon exemple d'interaction de gènes est celui de la couleur du pelage chez la souris qui est due à une batterie de gènes en interaction déterminant le type de pigments, leur distribution dans le poil et chez l'animal ainsi que la présence ou l'absence de pigments chez l'animal.

L'interaction de gènes produit souvent des rapports mendéliens modifiés en F_2. Quelques types d'interactions font l'objet d'une dénomination spécifique, tels que gènes complémentaires, épistatiques, suppresseurs et dupliqués. L'interaction entre gènes caractérise aussi bien les organismes haploïdes que diploïdes.

Les notions de pénétrance et d'expressivité constituent deux autres types de développements importants de l'analyse mendélienne. La pénétrance est le pourcentage d'individus d'un génotype donné exprimant le phénotype associé à ce génotype. Quant à l'expressivité, elle désigne le degré d'expression d'un génotype en tant que phénotype. Une pénétrance incomplète et une expressivité variable sont causées par la variation génétique et du milieu.

Diagramme conceptuel.

Faites un schéma associant autant que possibles les termes suivants. Ceux-ci ne sont pas présentés dans un ordre particulier.

dihybride / environnement / rapport mendélien modifié / interaction entre gènes / autofertilité / rapport 9: 3: 4 / pénétrance / épistasie récessive.

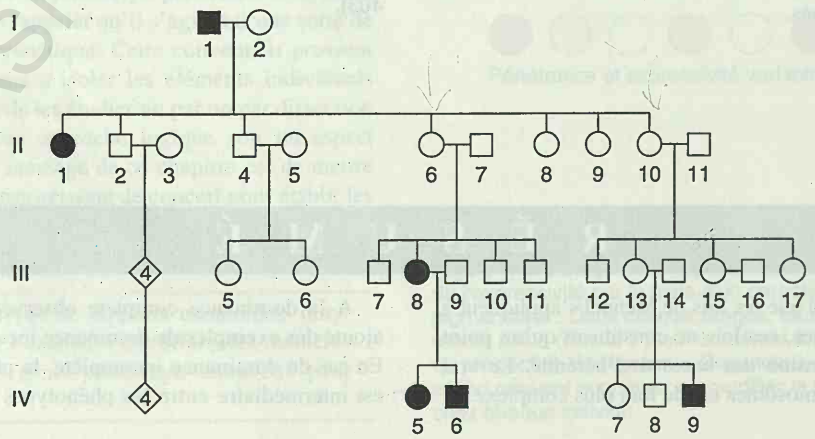
PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Sur la base de la plupart des arbres généalogiques, la polydactylie (figure 2-18) se présente comme un caractère dominant autosomique, mais les arbres généalogiques de certaines familles ne correspondent pas totalement au mode d'hérédité attendu sur cette base. Un tel arbre est représenté en bas de la page. (Les losanges indiquent le nombre d'individus non-affectés de sexe non-déterminé).

a. Quelle anomalie cet arbre généalogique comporte-t-il ?
b. Quel phénomène génétique illustre-t-il ?
c. Suggérez un mécanisme spécifique d'interaction génique qui pourrait donner lieu à un tel arbre, en indiquant les génotypes des membres cruciaux de la famille.

Solution

a. Il s'agit d'un dominant autosomique, chaque individu affecté devrait avoir un parent affecté, ce qui n'est pas le cas dans cette arbre généalogique. Comment cette anomalie peut-elle être expliquée ? Se pourrait-il que quelques cas de polydactylie soient dus à un gène différent qui serait dominant et lié au chromosome X ?



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ceci n'est pas une suggestion utile, puisqu'elle n'explique pas l'absence du caractère chez les individus II-6 et II-10. En outre, si l'on postule une hérédité de type récessif, tant autosomique que liée au sexe, plusieurs personnes de l'arbre généalogique devraient être hétérozygotes, ce qui ne convient pas puisque la polydactylie est peu fréquente.

b. Ceci nous laisse avec le fait que la polydactylie peut être parfois de pénétrance incomplète. Nous avons appris dans ce chapitre que certains individus n'expriment pas le phénotype particulier correspondant à leur génotype. Dans notre cas, II-6 et II-10 semblent appartenir à cette catégorie; ils doivent être porteurs du gène de polydactylie hérité de I-1 puisqu'ils transmettent ce caractère à leur descendance.

c. Dans ce chapitre, nous avons vu que la suppression de l'expression d'un gène par le milieu peut être la cause d'une pénétrance incomplète, de la même façon que la suppression due à une autre gène. Pour donner l'explication génétique adéquate, nous devons formuler une hypothèse. Que devons-nous expliquer ? La clef du problème réside dans le fait que I-1 transmet le gène à deux types de descendance, représentés par II-1, qui exprime le gène, et par II-6 et II-10 qui ne l'expriment pas. (Sur la base de l'arbre généalogique, nous ne pouvons dire si les autres enfants de I-1 possèdent le gène ou non). S'agit-il de suppression génétique ? I-1 ne possède pas d'allèle suppresseur parce qu'il exprime la polydactylie. Donc le seul individu qui pourrait fournir un suppresseur est I-2. En plus, I-2 devrait être hétérozygote pour le suppresseur puisqu'au moins un de ses enfants est polydactyle. Nous aboutissons donc à formuler l'hypothèse que l'union dans la génération I a dû être

(I-1) Ppss x (I-2) ppSs

où S est le suppresseur et P l'allèle responsable de la polydactylie. Partant de cette hypothèse, nous pouvons prédire que la descendance présentera les quatre types suivants si les gènes s'assortissent indépendamment :

Génotype	Phénotype	Exemple
PpSs	normal (par suppression)	II-6, II-10
Ppss	polydactyle	II-1
ppSs	normal	
ppss	normal	

Si S est peu fréquent, les unions et descendances de II-6 et de II-10 conduisent probablement à

Génotype de la descendance	Exemple
PpSs	III-13
Ppss	III-8
ppSs	
ppss	

Nous ne pouvons exclure la possibilité que II-2 et II-4 aient un génotype PpSs et que par chance aucun de leur descendants ne soit affecté.

Notez que nous n'avons fait usage ici que de concepts présentés au Chapitre 1 (effets du milieu), Chapitre 2 (hérédité mendélienne), Chapitre 3 (localisation chromosomique des gènes), et Chapitre 4 (interactions entre gènes).

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Chez une espèce de coléoptère, les élytres sont soit verts, soit bleus, soit turquoise. A partir d'une population de laboratoire constituée par un mélange d'individus se croisant librement, une série de coléoptères vierges furent sélectionnés et utilisés dans des croisements spécifiques afin de déterminer l'hérédité de la couleur des élytres. Les résultats furent les suivants :

Croisement	Parents	Descendance
1	bleu × vert	toute bleue
2	bleu × bleu	$\frac{3}{4}$ bleue : $\frac{1}{4}$ turquoise
3	vert × vert	$\frac{3}{4}$ verte : $\frac{1}{4}$ turquoise
4	bleu × turquoise	$\frac{1}{2}$ bleue : $\frac{1}{2}$ turquoise
5	bleu × bleu	$\frac{3}{4}$ bleue : $\frac{1}{4}$ verte
6	bleu × vert	$\frac{1}{2}$ bleue : $\frac{1}{2}$ verte
7	bleu × vert	$\frac{1}{2}$ bleue : $\frac{1}{4}$ verte $\frac{1}{4}$ turquoise
8	turquoise × turquoise	toute turquoise

a. Déduisez-en la base génétique de la couleur des élytres chez cette espèce.

b. Donnez les génotypes de tous les parents et de leur descendance aussi complètement que possible.

Solution

a. Ces données semblent complexes à première vue, mais le mode d'hérédité se révèle clairement si nous considérons les croisements un à un. Un principe général s'appliquant à de tels problèmes consiste à ne pas nécessairement débuter par les premières données mais bien d'envisager l'ensemble des croisements et d'essayer d'établir les modes de transmission.

Un examen général des données permet d'établir que tous les rapports mentionnés sont dus à un seul gène : il n'y a pas d'indications permettant d'impliquer deux paires de gènes distincts. Comment une telle variabilité peut-elle s'expliquer dans le cas d'un seul gène ? Une réponse coulant de source est de faire intervenir l'allélisme multiple. Peut-être que trois allèles d'un gène unique sont impliqués: appellons *w* le gène (gouvernant la couleur

des élytres) et représentons ses allèles par w^v, w^b, w^t. Comment déterminer à présent les relations de dominance entre eux ?

Le croisement (1) fournit une information au sujet de la dominance, puisque la descendance d'un croisement bleu × vert est entièrement bleue ; le bleu apparaît donc dominant sur le vert. Cette conclusion est soutenue aussi par le croisement (5) puisque le déterminant vert doit être présent mais non exprimé dans le stock parental pour apparaître dans la descendance. Quant au déterminant turquoise, le croisement (3) permet de dire que les déterminants turquoise doivent être présents mais non exprimés dans le stock parental, puisqu'ils apparaissent en tant que phénotypes dans la descendance. Il en découle que le vert doit dominer le turquoise et nous avons établi un modèle où l'ordre de dominance est $w^b > w^v > w^t$. En effet, nous inférons que l'allèle w^t se situe en bas de l'échelle de dominance par les résultats du croisement (7) où le turquoise apparaît dans la descendance d'un croisement bleu × vert.

b. A présent, il nous reste à déduire les génotypes particuliers. Nous savons que les parents ont été obtenus à partir d'une population s'hybridant librement de sorte qu'ils peuvent être aussi bien homozygotes qu'hétérozygotes. Naturellement, une souche bleue peut être homozygote (w^bw^b) ou héterozygote (w^bw^v ou w^bw^t). A ce stade, on fera appel à des approximations successives ainsi qu'au bon sens. Les génotypes suivants expliquent les résultats obtenus. Un tiret indique un allèle homozygote *ou* un allèle situé plus bas dans la série allélique.

Croisement	Parents	Descendance
1	$w^bw^b \times w^v -$	w^bw^v ou $w^b -$
2	$w^bw^t \times w^bw^t$	$\frac{3}{4}\ w^b - : \frac{1}{4}\ w^tw^t$
3	$w^vw^t \times w^vw^t$	$\frac{3}{4}\ w^v - : \frac{1}{4}\ w^tw^t$
4	$w^bw^t \times w^tw^t$	$\frac{1}{2}\ w^bw^t : \frac{1}{2}\ w^tw^t$
5	$w^bw^v \times w^bw^v$	$\frac{3}{4}\ w^b - : \frac{1}{4}\ w^vw^v$
6	$w^bw^v \times w^vw^v$	$\frac{1}{2}\ w^bw^v : \frac{1}{2}\ w^vw^v$
7	$w^bw^t \times w^vw^t$	$\frac{1}{2}\ w^b - : \frac{1}{4}\ w^vw^t : \frac{1}{4}\ w^tw^t$
8	$w^tw^t \times w^tw^t$	tous w^tw^t

2. Les feuilles de l'ananas peuvent être classées en trois catégories: épineuses (S), épineuses au sommet (ST) ou sans épines (P). Suite à des croisements entre variétés pures, les résultats suivants ont été obtenus.

		Phénotypes	
Croisement	Phénotypes parentaux	F_1	F_2
1	ST × S	ST	99 ST : 34 S = 133
2	P × ST	P	120 P : 39 ST = 159
3	P × S	P	95 P : 25 ST : 8 S = 128

a. Définissez les gènes par des lettres. Expliquez ces résultats en termes de génotypes produits ainsi que de leurs rapports.

b. Sur la base du modèle de type (a), donnez les rapports phénotypiques attendus si vous croisez : (1) la descendance F_1 du croisement sans épines × épineux avec le stock parental épineux et (2) la descendance F_1 du croisement sans épines × épineux avec la descendance F_1 du croisement épineux × épineux au sommet.

Solution

a. Considérons d'abord les rapports F_2. Les rapports 3 : 1 des croisements (1) et (2) indiquent clairement des ségrégations monogéniques. Le croisement (3) se caractérise quant à lui presque sûrement par un rapport 12 : 3 : 1. Comment savons-nous ceci ? Pour la bonne raison qu'il n'existe pas tellement de rapports complexes en génétique, et des approximations successives nous conduisent très rapidement au rapport 12 : 3 : 1. Pour un nombre total de descendants de 128, les valeurs de 96 : 24 : 8 sont théoriquement attendues, et les nombres réels cadrent remarquablement avec ces prévisions.

L'un des principes de ce chapitre établit que des rapports mendéliens modifiés révèlent des interactions entre gènes. Le croisement (3) représente certainement une modification d'un rapport dihybride et tout se passe comme si nous avions affaire à une interaction de deux gènes. Envisageons ce cas comme point de départ ; ensuite nous reviendrons aux croisements (1) et (2).

Tout rapport dihybride est caractérisé par une répartition des phénotypes 9 : 3 : 3 : 1. Les modifications que nous observons se groupent comme suit :

9 *A – B –* 3 *A – bb*	12 non épineux
3 *aa B –*	3 épineux au sommet
1 *aa bb*	1 épineux

Aussi sans nous préoccuper du nom du type d'interaction impliqué — de toute façon, on ne nous le demande pas — nous pouvons déjà définir trois phénotypes de feuilles d'ananas sur la base des paires de gènes désignées arbitrairement *A / a* et *B/b* :

sans épines = *A* – (*B* / *b* n'intervient pas)
à épines au sommet = *aa B –*
épineux = *aa bb*

Qu'en est-il des parents du croisement (3) ? Le parent à épines doit être *aa bb* et puisque le gène *B* est nécessaire à l'obtention d'individus F_2 épineux au sommet, le parent sans épines doit être *AA BB*. (En effet, tous les parents sont purs, ou homozygotes). En conséquence la F_1 doit être *Aa Bb* (sans épines).

Nous pouvons donc écrire le croisement (1) comme suit :

aa BB × *aa bb* ⟶ *aa Bb* → $\frac{3}{4}$ *aa Bb*, $\frac{1}{4}$ *aa bb*

BCU IAS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Le croisement (2) peut aussi se concevoir du moins en partie, en utilisant nos symboles géniques arbitraires :

$$AA - - \times aa\ BB \longrightarrow Aa\ B - \begin{cases} \nearrow \frac{3}{4} A - - - \\ \searrow \frac{1}{4} aa\ B - \end{cases}$$

Nous savons que cette série montre une ségrégation monogénique (un rapport 3:1 est obtenu à la F_2) et il est à présent certain que la paire de gènes *Aa* est impliquée. Mais l'allèle *B* est nécessaire pour produire le phénotype épineux au sommet. Tous les individus doivent donc être des homozygotes *BB*:

$$AABB \times aaBB \longrightarrow AaBB \begin{cases} \nearrow \frac{3}{4} A - BB \\ \searrow \frac{1}{4} aaBB \end{cases}$$

Notez que les ségrégations monogéniques des croisements (1) et (2) n' indiquent pas qu' il y ait interaction entre les paires de gènes dans ces croisements. L'interaction des deux paires de gènes n'est pas *révélée* par ces croisements; elle n'apparaît que par la configuration du croisement (3) qui est hétérozygote pour les deux paires de gènes.

b. Maintenant il s'agit simplement d'utiliser les lois de Mendel pour prédire les résultats des croisements :

(1) *Aa Bb* × *aa bb* (assortiment indépendant dans un croisement-test standad) ⟶
- $\frac{1}{4}$ *Aa Bb* } $\frac{1}{2}$ sans épines
- $\frac{1}{4}$ *Aa bb* }
- $\frac{1}{4}$ *aa Bb* à épines au sommet
- $\frac{1}{4}$ *aa bb* épineux

(2) *Aa Bb* × *aa Bb* ⟶

$\frac{1}{2}$ *Aa* ⟶
- $\frac{3}{4}$ *B* − ⟶ $\frac{3}{8}$ } $\frac{1}{2}$ sans épines
- $\frac{1}{4}$ *bb* ⟶ $\frac{1}{8}$ }

$\frac{1}{2}$ *aa* ⟶
- $\frac{3}{4}$ *B* − ⟶ $\frac{3}{8}$ épines au sommet
- $\frac{1}{4}$ *bb* ⟶ $\frac{3}{8}$ épineux

PROBLÈMES

1. Si un homme de groupe sanguin AB épouse une femme du groupe A dont le père appartient au groupe O, quels types sanguins différents peut-on attendre chez leurs enfants ?

2. Des poules «herminette» sont revêtues principalement de plumes claires avec occasionnellement une noire, ce qui leur donne un aspect moucheté. Un croisement entre deux herminettes donna 48 descendants dont 22 herminettes, 14 noires et 12 blanches. Quelle base génétique suggérez-vous pour le type herminette ? Comment testeriez-vous votre hypothèse ?

3. Les radis peuvent être de forme allongée, ronde ou ovale, et de couleur rouge, blanche ou pourpre. Vous croisez une variété blanche de forme allongée avec une variété rouge et de forme ronde et obtenez une F_1 pourpre, de forme ovale. La F_2 comporte neuf classes phénotypiques comme suit : 9 allongé, rouge; 15 allongé, pourpre; 19 ovale, rouge; 32 ovale, pourpre; 8 long, blanc; 16 rond, pourpre; 8 rond, blanc; 16 ovale, blanc et 9 rond, rouge.

a. Etablissez le fondement génétique de ces résultats. Définissez tout d'abord les génotypes et la constitution des parents F_1 et F_2.

b. Pouvez-vous prédire les proportions entre génotypes et phénotypes dans la descendance du croisement radis allongé, pourpre avec un radis ovale, pourpre.

4. Dans une série d'allèles multiples, la dominance s'établit comme suit : $C^+ > C^{ch} > C^h$. Quelle proportion de la descendance du croisement C^+C^{ch} x $C^{ch}C^h$ sera-t-elle himalayenne ? **a)** 100 pour cent; **b)** 3/4 ; **c)** 1/2 ; **d)** 1/4 ; **e)** 0 pour cent.

5. Chez le cobaye, noir, sépia, crème et albinos sont des couleurs du pelage. Des individus présentant ces couleurs du pelage et qui ne sont pas nécessairement des lignées pures, sont croisés entre eux ; les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous, en utilisant les abréviations A, albinos; B, noir; C, crème et S, sépia pour désigner les phénotypes:

	phénotype	phénotype de la descendance			
Croisement	parental	B	S	C	A
1	B × B	22	0	0	7
2	B × A	10	9	0	0
3	C × C	0	0	34	11
4	S × C	0	24	11	12
5	B × A	13	0	12	0
6	B × C	19	20	0	0
7	B × S	18	20	0	0
8	B × S	14	8	6	0
9	S × S	0	26	9	0
10	C × A	0	0	15	17

a. Déduisez l'hérédité des couleurs du pelage en utilisant des symboles de gènes à votre choix. Décrivez tous les génotypes, tant parentaux que de la descendance.

b. Si les animaux noirs obtenus dans la descendance des croisements (7) et (8) sont croisés, quelles proportions pouvez-vous prévoir dans leur descendance ?

BRUNEL UNIVERSITY LIBRARY

6. Dans une pouponnière, quatre bébés sont intervertis accidentellement. Leurs groupes sanguins sont du type O, A, B et AB. Les types ABO des quatre couples de parents sont connus. Déterminez quel bébé appartient à quel couple de parents : a) AB x O ; b) A x O; c) A x AB ; d) O x O.

7. Outre le système ABO, deux autres formes de polymorphisme sanguin peuvent être considérées chez l'homme. Les groupes sanguins M, N et MN sont déterminés par deux allèles L^M et L^N. Le groupe Rh^+ (rhésus positif) est dû à un allèle dominant *R* d'un autre gène. Dans un affaire de revendication de paternité, deux hommes affirment chacun que les trois enfants qui sont la cause du litige sont de lui. Les groupes sanguins des hommes, des enfants et de leur mère sont les suivants :

Personne	Groupe sanguin		
Mari	O	M	Rh^+
Amant de la femme	AB	MN	Rh^-
Femme	A	N	Rh^+
Enfant 1	O	MN	Rh^+
Enfant 2	A	N	Rh^+
Enfant 3	A	MN	Rh^-

La paternité des enfants peut-elle être établie sur cette base ?

8. Dans une ferme d'élevage de renards du Wisconsin se produisit une mutation se caractérisant par la couleur «platine» du pelage. Cette couleur platine connut beaucoup de succès parmi les amateurs de peaux de renard, mais les sélectionneurs ne purent obtenir une souche platine pure par croisement. A chaque fois que deux individus de couleur platine furent croisés, quelques individus normaux apparurent dans la descendance. Une même paire produisit par exemple 82 individus de couleur platine et 38 normaux. Elaborez une hypothèse génétique *concise* rendant compte de ces résultats.

9. Pendant plusieurs années, Hans Nachtsheim étudia le cas d'une anomalie héréditaire des globules blancs chez le lapin. Cette anomalie, dite de Pelger, entraîne l'arrêt de la segmentation typique des noyaux de certains globules blancs. Cette anomalie n'entraîne apparemment pas d'inconvénients sérieux pour les lapins.

a. Lorsque des lapins montrant l'anomalie de Pelger furent croisés avec des lapins normaux de souche pure, Nachtsheim dénombra 217 descendants montrant l'anomalie de Pelger et 237 descendants normaux. Quelle est la base génétique de cette anomalie ?

b. Lorsque des lapins de type Pelger furent croisés entre eux, Nachtsheim dénombra 223 descendants normaux, 439 avec l'anomalie de Pelger et 39 extrêmement anormaux, caractérisés non seulement par des globules blancs non-fonctionnels, mais aussi par des difformités du squelette ; presque tous moururent peu après la naissance. En termes génétiques, que supposez-vous que représente cette classe de lapins extrêmement anormaux ? Pourquoi, selon vous, n'en trouve-t-on que 39 ?

c. Quelles données expérimentales supplémentaires pourriez-vous rassembler pour confirmer ou infirmer vos réponses à la partie b?

d. A Berlin, un habitant sur 1000 environs présente une anomalie de Pelger au niveau des globules blancs très similaire à celle décrite chez le lapin. Cette anomalie s'hérite comme un simple gène dominant, mais la forme homozygote n'a pas encore été observée chez l'homme. Pourriez-vous suggérer pourquoi, par analogie avec les conditions connues chez le lapin ?

e. En recourant une nouvelle fois à l'analogie avec le lapin, à quelles situations génétiques vous attendriez-vous chez les enfants d'un couple dont chaque membre aurait l'anomalie de Pelger ?

(Le problème 9 provient de A.M. Srb, R.D. Owen, et R.S. Edgar, *General Genetics*, 2ème ed.chez W.H. Freeman and Company, 1965.)

10. Deux mouches à fruit de phénotypes normaux ont été croisées et dans leur descendance on dénombre 202 femelles et 98 mâles.

a. Qu' y a-t-il d' inhabituel dans ces résultats ?

b. Donnez une explication génétique à cette anomalie.

c. Comment testeriez-vous votre hypothèse ?

11. Vous observez que les soies thoraciques d'une femelle vierge donnée de *Drosophila* sont plus courtes que la normale. Vous la croisez avec un mâle normal (à soies longues) et obtenez la descendance F_1 suivante : 1/3 de femelles à soies courtes, 1/3 de femelles à soies longues et 1/3 de mâles à soies longues. Le croisement des femelles F_1 à soies longues avec leurs frères donne 1/3 de femelles à soies courtes, 1/3 de femelles à soies longues et 1/3 de mâles à soies longues. Expliquez ces résultats.

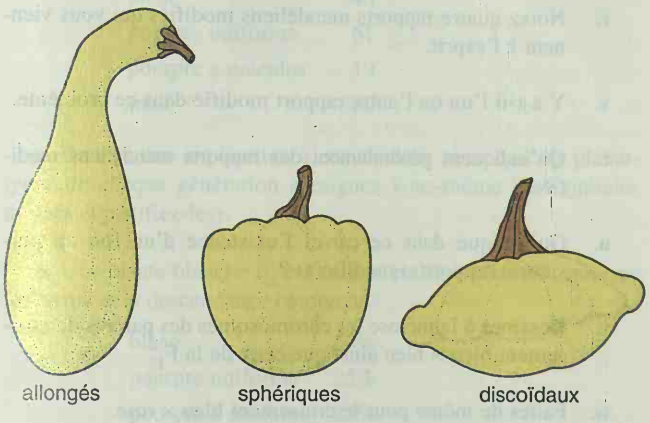
12. Chez la drosophile, un allèle dominant *H* réduit le nombre de soies, donnant lieu au phénotype «glabre». *H* est létal à l'état homozygote. Un autre allèle dominant *S*, non lié, n'a pas d'influence sur la pilosité sauf en présence de *H* ; dans ce cas une simple dose de *S* supprime le phénotype glabre, et rétablit donc le type poilu. Cependant, *S* est aussi létal sous forme homozygote (SS).

a. Quel est le rapport entre individus poilus et glabres parmi la descendance viable d'un croisement entre deux mouches poilues porteuses toutes deux de *H* en condition de suppression ?

b. Si la descendance glabre est croisée en retour avec une mouche parentale, quel rapport phénotypique escomptez-vous parmi les descendants viables ?

13. Une lignée pure de courge à fruits en forme de disque est croisée avec une lignée pure à fruits allongés. La F_1 a des fruits discoïdaux, et la F_2 se caracterise par un nouveau phénotype, en forme de sphère. Elle se compose de :

270 fruits discoïdaux
178 fruits sphériques
32 fruits allongés



Comment interprétez-vous ces résultats ? Etablissez les phénotypes des parents et des générations F_1 et F_2.

(Illustration de P.J. Russell, Genetics, 3ème édition, Harper et Collins, 1992).

14. La couleur rouge pourpre des pétales des mufliers (*Antirrhinum*) est due à une anthocyane. Deux lignées pures sans anthocyane furent obtenues, l'une en Californie, l'autre en Hollande. Elles étaient identiques par le manque total de pigment rouge et donc porteuses de fleurs blanches. Cependant, lorsque des pétales des deux lignées sont broyées ensemble dans un tampon dans le même tube à essai, la solution, incolore au départ, se colore graduellement en rouge.

a. Quelles expériences contrôle devraient être menées avant d'aller plus loin dans l'analyse?

b. Qu'est-ce qui peut rendre compte de la coloration rouge apparaissant dans le tube à essai?

c. Selon l' explication donnée en b, quelles seraient les génotypes des deux lignées?

d. Si les deux lignées blanches sont croisées, que peut-on dire des phénotypes de la F_1 et de la F_2?

15. La poule frisée est très appréciée par les amateurs de volailles. Son nom provient de la façon inhabituelle dont ses plumes se hérissent, donnant l'impression (selon les termes mémorables du généticien animal F.D. Hutt) d'avoir été «tirées à rebrousse-plumes». Malheureusement, ces poules frisées ne se reproduisent pas en tant que telles; lorsque deux poules frisées sont croisées, elle donnent toujours naissance à 50 pour cent de frisées, 25 pour cent de poules normales et 25 pour cent de poules à plumes laineuses qui tombent prématurément, laissant la peau nue.

a. Donnez une interprétation génétique à ces résultats, en y

b. Si vous désireriez obtenir en abondance des poules frisées, quels types seraient les plus indiqués comme parents?

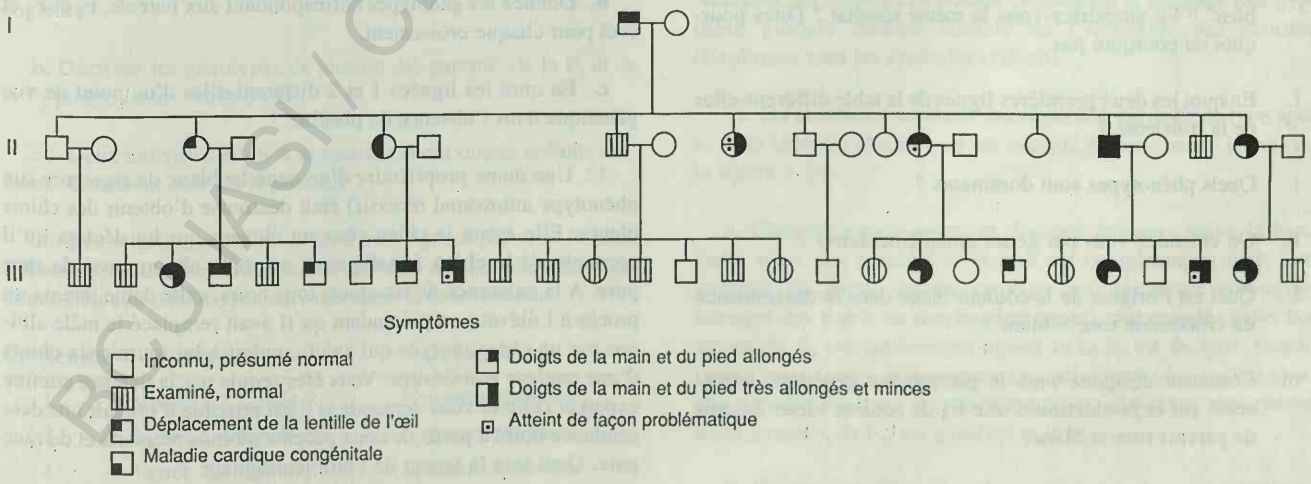
16. Le syndrome de Marfan désigne une anomalie des tissus conjonctifs fibreux, caractérisée par de nombreux symptômes tels que doigts allongés et minces, défauts de l'oeil, maladies cardiaques et membres allongés.

a. En utilisant l'arbre généalogique ci-joint, donnez le mode d'hérédité du syndrome de Marfan.

b. Quel phénomène génétique apparaît dans ce pédigré ?

c. Quelles sont les bases possibles d'un tel phénomène ?

(Illustration de J.V. Neel et W.J. Schull, *Human Heredity*, University of Chicago press, 1954).



ROUKASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

17. Les pétales de la fleur de *Collinsia parviflora* sont normalement bleus. Deux lignées pures ont été obtenues à partir de variants de la couleur des pétales trouvés dans la nature; la première se caractérise par des pétales roses et la seconde par des pétales blancs. Les croisements suivants ont été réalisés entre lignées pures et en voici les résultats:

Parents	F_1	F_2
bleu × blanc	bleu	101 bleu, 33 blanc
bleu × rose	bleu	192 bleu, 63 rose
rose × blanc	bleu	272 bleu, 121 blanc, 89 rose

a. Fournissez la base génétique de ces résultats. Définissez les symboles que vous utilisez pour désigner les allèles et donnez la constitution génétique des parents, des F_1 et des F_2.

b. Un croisement entre une certaine plante F_2 et une certaine plante F_2 blanche a donné une descendance dont $\frac{3}{8}$ des plantes étaient bleues, $\frac{1}{8}$ roses et $\frac{1}{2}$ blanches. Quels devraient être les génotypes des ces deux plantes F_2?

Décomposons le problème

a. Quel est le caractère étudié ?

b. Quel est le phénotype de la fleur sauvage ?

c. Qu'est ce qu'un variant ?

d. Quels sont les variants dans ce problème ?

e. Que signifie "dans la nature" ?

f. De quelle faÿon les variants auraient-ils pu être découverts dans la nature ? (Décrivez comment cela a pu se passer .)

g. A quelles phases des expériences des graines pourraient-elles être utilisées ?

h. La faÿon d'écrire le croisement "bleu × blanc" (par exemple) aurait-elle la même signification que "blanc × bleu" ? En attendriez-vous le même résultat ? Dites pourquoi ou pourquoi pas.

i. En quoi les deux premières lignes de la table différent-elles de la troisième ?

j. Quels phénotypes sont dominants ?

k. Qu'entendez-vous par gènes complémentaires ?

l. Quel est l'origine de la couleur bleue dans la descendance du croisement rose × blanc ?

m. Comment désignez-vous le phénomène génétique représenté par la production d'une F1 de couleur bleue à partir de parents rose et blanc.

n. Notez tous les rapports que vous pouvez identifier.

o. S'agit-il de rapports monohybrides ?

p. Y a-t-il des rapports dihybrides ?

q. Que vous indique l'observation de rapports monohybrides et dihybrides.

r. Notez quatre rapports mendéliens modifiés qui vous viennent à l'esprit.

s. Y a-t-il l'un ou l'autre rapport modifié dans ce problème.

t. Qu'indiquent généralement des rapports mendéliens modifiés.

u. Qu'indique dans ce cas-ci l'existence d'un (ou de plusieurs) rapport(s) modifié(s) ?

v. Dessinez à la méiose les chromosomes des parents du croisement bleu × bleu ainsi que ceux de la F_1.

w. Faites de même pour le croisement bleu × rose.

18. Chez le pois (*Pisum sativum*), la présence de pisatine est associée à la défense contre des champignons parasites : normalement les plantes sont résistantes aux champignons et contiennent de la pisatine . Deux lignées pures ont été obtenues, toutes deux sans pisatine et très susceptibles aux attaques de champignons. La lignée 1 provenait de Californie et la lignée 2 de Suède. Une série d'experiences furent menées avec ces lignées. (Les lignées normales sont aussi des lignées pures).

Croisement	Phénotypes F1	Phénotypes F2
lignée 1 × normale	avec pisatine	$\frac{3}{4}$ avec, $\frac{1}{4}$ sans
lignée 2 × normale	sans pisatine	$\frac{3}{4}$ sans, $\frac{1}{4}$ avec
lignée 1 × lignée 2	sans pisatine	$\frac{13}{16}$ sans, $\frac{3}{16}$ avec

a. Elaborez un modèle expliquant le résultat de ces croisements. Assurez-vous de définir avec précision tout symbole allélique utilisé.

b. Donnez les génotypes correspondant aux parents, F_1 et F_2 et ceci pour chaque croisement.

c. En quoi les lignées 1 et 2 différent-elles d'un point de vue génétique dans l'absence de pisatine ?

19. Une dame propriétaire d'un caniche blanc de race pure (un phénotype autosomal récessif) était désireuse d'obtenir des chiots blancs. Elle mena le chien chez un éleveur qui lui déclara qu'il accouplerait le chien femelle avec un mâle albino aussi de race pure. A la naissance de six chiots tous noirs, cette dame intenta un procès à l'éléveur en prétendant qu'il avait remplacé le mâle albinos par un chien noir, ce qui avait conduit à lui fournir six chiots d'une couleur non-désirée. Vous êtes requis par la défense comme expert et celle-ci vous demande si il est possible d'obtenir une descendance noire à partir de deux parents albinos récessifs et de race pure. Quel sera la teneur de votre témoignage ?

20. Un muflier donnant des fleurs à pétales blancs par autofécondation a été croisé avec une plante donnant elle des fleurs à

pétales pourpres par autofécondation. Toutes les plantes F_1 ont des fleurs à pétales blancs. Dans la F_2, obtenue par autofécondation de la F_1, trois phénotypes furent observés dans les proportions suivantes :

blanc	240
pourpre uniforme	61
pourpre à macules	19
total	360

a. Donnez une explication à ces résultats ainsi que les phénotypes de chaque génération (désignez vous-même les symboles utilisés et justifiez-les).

b. Une plante blanche F_2 est croisée par une plante F_2 pourpre uniforme et la descendance comprend :

blanc	50%
pourpre uniforme	25%
pourpre à macules	25%

Quels étaient les génotypes des plantes F_2 utilisées dans le croisement ?

21. La plupart des ténébrions sont noirs, mais des variations de couleur ont été identifiées. Des croisements entre lignées parentales pures donnent les résultats suivants dans la génération F_1, et les croisements entre F_1 donnent pour chacun d'entre eux les rapports mentionnés pour la F_2. Les abréviations des différents phénotypes sont Bl, noir; Br, brun, Y, jaune; et W, blanc.

Croisement	Parents	F_1	F_2
1	Br × Y	Br	3 Br : 1 Y
2	Bl × Br	Bl	3 Bl : 1 Br
3	Bl × Y	Bl	3 Bl : 1 Y
4	W × Y	Bl	9 Bl : 3 Y : 4 W
5	W × Br	Bl	9 Bl : 3 Br : 4 W
6	Bl × W	Bl	9 Bl : 3 Y : 4 W

a. A partir de ces résultats, déduisez et expliquez l'hérédité des couleurs.

b. Décrivez les génotypes de chacun des parents, de la F_1 et de la F_2 pour tous les croisements.

22. Deux individus albinos se marient et ont quatre enfants normaux. Comment cela est-il possible ?

23. Des selectionneurs ont obtenu trois lignées pures de *Petunia* à fleurs blanches. Les croisements suivants ont été réalisés et ont donné lieu aux phénotypes suivants dans la descendance :

Croisement	Parents	Descendance
1	lignée 1 × lignée 2	F_1 toutes blanches
2	lignée 1 × lignée 3	F_1 toutes rouges
3	lignée 2 × lignée 3	F_1 toutes blanches
4	rouge F_1 × lignée 1	$\frac{1}{4}$ rouges : $\frac{3}{4}$ blanches
5	rouge F_1 × lignée 2	$\frac{1}{8}$ rouges : $\frac{7}{8}$ blanches
6	rouge F_1 × lignée 3	$\frac{1}{2}$ rouges : $\frac{1}{2}$ blanches

a. Expliquez ces résultats en utilisant des symboles de votre choix pour désigner les gènes. (Indiquer les génotypes des parents et de la descendance pour chaque croisement).

b. Si un individu F_1 rouge issu du croisement 2 est croisé avec un individu F_1 blanc provenant du croisement 3, quelle proportion de la descendance sera-t-elle rouge ?

24. Chez le liseron du Japon (*Pharbitis nil*), la couleur pourpre des fleurs peut être due aux allèles dominants de deux paires de gènes différents (*A – bb* ou *aaB –*). *A – B –* produisent des pétales bleus et *aabb* des pétales écarlates. Sur la base des résultats des croisements suivants, déduisez les génotypes des parents et de leur descendance.

Croisement	Parents	Descendants
1	bleu × rouge	$\frac{1}{4}$ bleu : $\frac{1}{2}$ pourpre : $\frac{1}{4}$ rouge
2	pourpre × pourpre	$\frac{1}{4}$ bleu : $\frac{1}{2}$ pourpre : $\frac{1}{4}$ rouge
3	bleu × bleu	$\frac{3}{4}$ bleu : $\frac{1}{4}$ pourpre
4	bleu × pourpre	$\frac{3}{8}$ bleu : $\frac{3}{8}$ pourpre : $\frac{1}{8}$ rouge
5	pourpre × rouge	$\frac{1}{2}$ pourpre : $\frac{1}{2}$ rouge

25. Chez le maïs, on a obtenu des lignées qui présentent, après exposition au soleil, des grains rouges, roses, écarlates ou oranges (alors que les grains normaux restent jaunes après exposition au soleil). Les résultats de quelques croisements entre ces lignées sont présentés. Les phénotypes sont abrégés O, orange; P, rose; Sc, écarlate et SR, rouge.

		Phénotypes	
Croisement	Parents	F_1	F_2
1	SR × P	tous SR	66 SR : 20 P
2	O × SR	tous SR	998 SR : 314 O
3	O × P	tous O	1300 O : 429 P
4	O × Sc	tous Y	182 Y : 80 O : 58 Sc

Analysez les résultats de chaque croisement et élaborez une hypothèse globale rendant compte de l'*ensemble* des résultats. (Expliquez tous les symboles utilisés).

26. De nombreux animaux sauvages ont une robe de type agouti, dans laquelle chaque poil est marqué par une bande jaune (voir la figure 4-10).

a. Chez les souris noires et d'autres animaux noirs, la bande jaune n'est pas présente et le poil est complètement noir. Cette absence du motif agouti sauvage est dénommé non-agouti. Lorsque des souris de souche pure agouti sont croisées à des non-agouti, la F_1 est entièrement agouti et la F_2 est du type 3 agouti pour 1 non-agouti. Représentez ce croisement (*A* = agouti et *a* = non-agouti). Donnez les phénotypes et génotypes des parents, leurs gamètes, la F_1, ses gamètes et la F_2.

b. Une autre modification de couleur chez la souris substitue le brun au noir dans le poil sauvage. De tels types brun agouti sont dénommés cannelle. Quand des souris sauvages sont croisées avec

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

des cannelles, la F_1 est sauvage et la F_2 comporte 3 sauvages pour 1 cannelle. Représentez le croisement comme en a. (B = noir sauvage et b = cannelle).

c. Lorsque des souris de souche cannelle pure sont croisées avec des souris de souche non-agouti (noire) pure, la F_1 est sauvage. Utilisez un diagramme pour expliquer ce résultat.

d. Dans la F_2 du croisement décrit en c, une quatrième couleur, dénommée chocolat, se présente, différente de celles des parents cannelle et non-agouti et du type sauvage de la F_1. Les souris chocolat sont d'un brun prononcé. Quelle est leur constitution génétique ?

e. En supposant que les paires alléliques $A - a$ et $B - b$ s'assortissent indépendamment l'une de l'autre, qu'attendriez-vous des fréquences relatives des quatre types colorés de la F_2 décrits au point d. Etablissez le diagramme du croisement des points c et d, en indiquant les phénotypes et les génotypes (en y incluant les gamètes).

f. Quels phénotypes devrait-on observer et dans quelles proportions dans la descendance d'un croisement en retour de souris F_1 du point c avec le stock parental cannelle ? Avec le stock parental non-agouti (noir) ? Faites-en le diagramme.

g. Etablissez un diagramme d'un croisement-test pour la F_1 du point e. Quelles couleurs en résulteraient-elles et dans quelles proportions ?

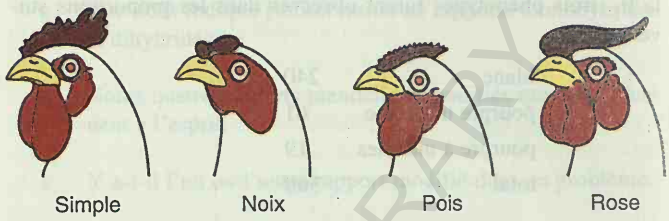
h. Des souris albinos sont homozygotes pour la forme récessive de la paire allélique $C - c$, qui ségrège indépendamment des paires $A - a$ et $B - b$. Supposez que vous disposiez de quatre lignées d'albinos (présumées homozygotes). Vous croisez chacune d' elles avec un type sauvage pur, et vous élevez une descendance F_2 abondante pour chacun de ces croisements. Quels génotypes déduiriez-vous sur la base des phénotypes F_2 du tableau ci-dessous pour les lignées albinos ?

	Phénotypes de la descendance				
Lignées en F_2	Type sauvage	Noir	Cannelle	Chocolat	Albinos
1	87	0	32	0	39
2	62	0	0	0	18
3	96	30	0	0	41
4	287	86	92	29	164

(Le problème 23 est tiré de A.M. Srb, R.D. Owen, et R.S. Edgar, *General Genetics*, 2ème ed. chez W.H. Freeman and Company, 1965)

27. Chez le rat, la couleur jaune du pelage est déterminée par un allèle A qui n'est pas létal à l'état homozygote. Pour un gène distinct du précédent, l'allèle R produit un pelage noir. Ensemble, A et R déterminent un pelage gris, alors que a et r se caractérisent par un pelage blanc. Un mâle gris est croisé avec une femelle jaune, et la F_1 contient $\frac{3}{8}$ de jaunes, $\frac{3}{8}$ de gris, $\frac{1}{8}$ de noirs et $\frac{1}{8}$ de blancs. Déterminez les génotypes des parents.

28. Chez la poule, le génotype *rr pp* donne une crête de type simple, $R - P -$ une crête de type noix (découpée comme une noix), $rr\ P -$ une crête de type pois et $R - pp$ une crête de type rose.



a. Quels types de crête apparaîtront-t-ils à la F_1 et à la F_2 et dans quelles proportions si l'on croise une poule à crête simple avec une poule à crête de type noix ?

b. Quels sont les génotypes des parents d'un croisement entre une race de type noix et une race de type rose qui produit $\frac{3}{8}$ de types roses, $\frac{3}{8}$ de types noix, $\frac{1}{8}$ de types pois et $\frac{1}{8}$ de types simples ?

c. Quels sont les génotypes des parents d'un croisement type noix × type rose dont toute la descendance est de type noix ?

d. Combien de génotypes conduiront-ils à un phénotype noix ? Ecrivez-les tous.

29. La production du pigment colorant les yeux de *Drosophila* requiert l'allèle dominant A. L'allèle dominant P d'un deuxième gène indépendant convertit la couleur rouge en couleur pourpre mais l'allèle récessif la laisse rouge. Une mouche dépourvue de pigment a les yeux blancs. Deux lignées pures ont donné les résultats suivants après croisement :

P femelle à oeil rouge × mâle à oeil blanc

↓

F_1 femelles à oeil pourpre

mâles à oeil rouge

$F_1 \times F_1$

↓

F2 { $\frac{3}{8}$ à oeil pourpre ; $\frac{3}{8}$ à oeil rouge ; $\frac{2}{8}$ à oeil blanc } tant mâles que femelles

Expliquez le type d'hérédité et donnez les génotypes des parents, de la F_1 et de la F_2.

30. Lorsque des chiens bruns de race pure sont croisés à des chiens blancs de race pure, tous les chiots F1 sont blancs. La F_2 issue de croisements $F_1 \times F_1$ comporte 118 chiots blancs, 32 noirs et 10 bruns. Quelle est la base génétique de ces résultats ?

31. Chez le maïs, trois allèles dominants, dénommés A, C et R, doivent être présents pour donner lieu à des graines colorées. Les génotypes $A - C - R -$ sont colorés : tous les autres sont incolores.

PSU AST/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Une plante colorée est croisée avec trois plantes-test de génotype connu. Avec *aa cc RR*, il se forme 50 pour cent de graines colorées ; avec *aa CC rr*, il se forme 25 pour cent de graines colorées ; et avec *AA cc rr*, il se forme 50 pour cent de graines colorées. Quel est le génotype de la plante colorée ?

32. La production de pigment dans le péricarpe du grain de maïs dépend de trois gènes qui doivent chacun être representés par au moins 1 allèle dominant, comme mentionné au problème 28. Un quatrième gène, l'allèle dominant *Pr*, est nécessaire pour convertir le composé précurseur en un pigment poupre, et son allèle recessif *pr* rend le pigment rouge. Les plantes qui ne synthétisent pas le pigment ont des grains jaunes. Considérez le croisement entre le génotype *AA CC RR prpr* et le génotype *aa cc rr PrPr*.

a. Quels sont les phénotypes des parents ?

b. Quelle sera le phénotype de la F_1 ?

c. Quels phénotypes, et dans quelles proportions, seront représentés dans la descendance de la F_1 autofécondée ?

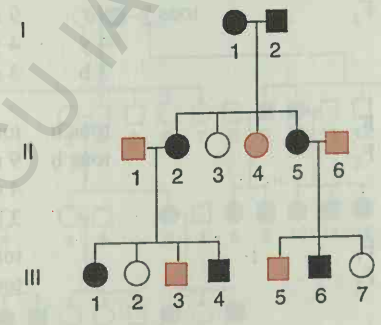
d. Quelles seraient les proportions entre descendants d'un test cross de la F_1 ?

33. Chez le champignon haploïde *Neurospora*, la souche sauvage synthétise son propre tryptophane. Un allèle muté *td* conduit à l'incapacité de synthétiser le tryptophane , de telle sorte qu'une souche de génotype *td* ne croît que si du tryptophane est adjoint au milieu. L'allèle *su* ségrège indépendamment de *td* ; son seul effet connu est de supprimer le phénotype *td*. Il en résulte que des souches portant à la fois *td* et *su* n'exigent pas de tryptophane pour leur croissance.

a. Si une souche *td su* est croisée avec une souche de génotype sauvage, quels sont les génotypes attendus dans la descendance, et dans quelles proportions ?

b. Quel sera le rapport dans la descendance entre individus exigeant et n'exigeant pas le tryptophane dans le cas du croisement a?

34. Chez la souris, l'allèle *B* donne un pelage noir, et *b* un pelage brun. En présence du génotype *ee* (un autre gène à ségrégation indépendante), l'expression de *B* et *b* est supprimée, ce qui produit un pelage beige, tandis qu'elle est permise en présence de *E*–. Les gènes sont tous deux autosomiques. Dans ce pedigré, les symboles noirs coïncident avec un pelage noir, les symboles roses avec un pelage brun et les symboles blancs avec un pelage beige.



a. Quel nom peut-on donner au type d'interaction génique présenté dans cet example ?

b. Quels sont les génotypes de chaque individu dans le pedigré (s'il y a plus d'une possibilité, mentionnez les.)

35. Chez la souris, un croisement est opéré entre les génotypes *AA BB CC DD SS* et *aa bb cc dd ss*. (Les symboles de ces gènes sont expliqués dans ce chapitre). Les individus de la descendance sont croisés entre eux. Quels phénotypes seront produits dans la F_2 et dans quels rapports ?

36. Considérez les génotypes de deux lignées pures de poulet, l'une (Mottled Hondan) est *ii DD MM WW* et l'autre (Leghorn) est *II dd mm ww*, avec

I : plumes blanches	*i* : plumes colorées
D : crête double	*d* : crête simple
M : barbu	*m* : sans barbe
W : peau blanche	*w* : peau jaune

Les quatre gènes ségrègent indépendamment. En partant de ces deux lignées pures, quelle est la faÿon la plus aisée de produire une lignée pure à plumes colorées, à crête simple, à peau jaune et sans barbe ? Assurez-vous de montrer:

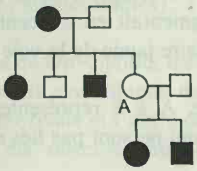
a. le schéma de selection;

b. le génotype de chaque animal qui y figure;

c. combien d'oeufs doivent être pondus pour chaque croisement, et justifiez ce nombre;

d. pourquoi votre schéma est-il à la fois le plus rapide et le plus aisé.

37. Le pedigré suivant concerne un phénotype dominant déterminé par un gène autosomique. Que suggère le pedigré quant au phénotype, et que pouvez-vous déduire au sujet du génotype de l'individu A ?



38. Le déterminisme génétique de la couleur des pétales chez la digitale est donné à la figure 4-17. Considérez les deux croisements suivants :

Croisement	Parents	Descendance
1	magenta sombre × blanc à macules jaunâtres	$\frac{1}{2}$ magenta sombre ; $\frac{1}{2}$ magenta clair
2	blanc à macules jaunâtres × magenta clair	$\frac{1}{2}$ blanc à macules magenta ; $\frac{1}{4}$ magenta sombre ; $\frac{1}{4}$ magenta clair

Dans chaque cas, donnez les génotypes des parents et des descen-

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

dances pour les trois gènes en cause.

39. Chez des plantes d'*Antirrhinum*, deux lignées pures à fleurs blanches sont croisées avec les résultats suivants :

lignée pure blanche 1 × lignée pure blanche 2

↓

F_1 tous blancs

$F_1 \times F_1$

↓

F_2 131 blancs

29 rouges

a. Déduisez l'hérédité de ces phénotypes en utilisant des symboles de gènes bien définis. Etablissez les génotypes parentaux, ainsi que ceux de la F_1 et de la F_2.

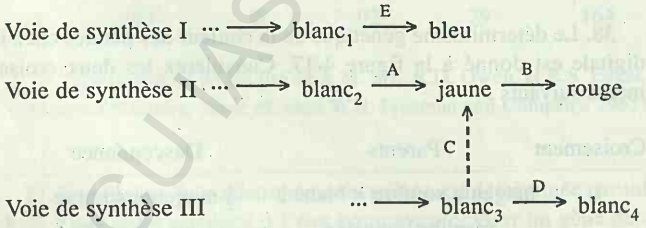
b. Prédisez le résultat des croisements de la F_1 avec chacune des lignées parentales.

40. Pour ce problème, nous considérons comme un fait connu que les enzymes sont codées par les gènes — un concept qui n'est pas formellement envisagé avant le chapitre 12. Cependant, c'est une notion qu'il est bon de considérer ici, puisqu'elle établit une nette relation entre les interactions géniques et le métabolisme cellulaire.

Disons que chez le pétunia, la coloration pourpre normale est le résultat d'un mélange de deux pigments, l'un rouge, l'autre bleu, synthétisés par des voies biochimiques distinctes, dans les deux lignes supérieures du diagramme. «Blanc» est associé à des composés qui ne sont pas des pigments. (Le manque total de pigments ci-dessous donne des pétales blancs). Le pigment rouge est formé à partir d'un composé intermédiaire jaune dont la faible concentration n'est normalement pas décelable.

Une troisième voie de biosynthèse n'impliquant que des composés qui ne sont pas des pigments n'affecte pas les voies conduisant aux pigments bleu et rouge, mais si l'un des produits intermédiaires ($blanc_3$) augmentait en concentration, il pourrait être converti en l'intermédiaire jaune de la voie conduisant au pigment rouge.

Dans le diagramme, A à E représentent des enzymes et les gènes correspondants, qui ne sont pas liés entre eux.



Si les allèles sauvages sont dominants et représentent des enzymes fonctionnelles, et que les allèles récessifs mutants représentent des enzymes dépourvues de fonction, établissez quelles combinaisons de génotypes parentaux produiront les rapports suivants dans la F_2:

a. 9 pourpres : 3 verts : 4 bleus

b. 9 pourpres : 3 rouges : 3 bleus : 1 blanc

c. 13 pourpres : 3 bleus

d. 9 pourpres : 3 rouges : 3 verts : 1 jaune

(REMARQUE : Le bleu mélangé au jaune donne du vert ; considérez qu'aucune mutation n'est létale.)

41. Les fleurs de capucine (*Tropaeolum majus*) peuvent être simples (S), doubles (D), ou superdoubles (Sd). Les superdoubles sont des femelles stériles; elles sont issues d'une variété à fleurs doubles. Des croisements entre variétés ont donné lieu aux descendances reprises dans la table suivante.

Croisement	Parents	Descendance
1	Lignée pure S × Lignée pure D	tous S
2	Croisement 1 F_1 × Croisement 1 F_1	78 S : 27 D
3	Lignée pure D × Sd	112 Sd : 108 D
4	Lignée pure S × Sd	8 Sd : 7S
5	Lignée pure D × Croisement 4 descendance Sd	18 Sd : 19 S
6	Lignée pure D × Croisement 4 descendance S	14D : 16 S

En utilisant vos propres symboles, proposez une explication aux résultats présentés, en donnant (a) tous les génotypes de chacun de ces six croisements et (b) une proposition sur l'origine du superdouble.

42. Chez une espèce de mouche, la couleur normale de l'oeil est rouge (R). Quatre phénotypes anormaux de la couleur de l'oeil ont été décelés: deux d'entre eux sont jaunes (Y1 et Y2), un autre brun (B) et un autre orange (O). Une lignée pure a été obtenue pour chaque phénotype et toutes les combinaisons possibles furent croisées. Les mouches de chacune des F_1 furent interfécondées pour obtenir une F_2. Les F_1 et les F_2 sont reprises dans le carré ci-dessous; les lignées pures sont indiquées dans les marges.

		Y1	Y2	B	O
Y1	F_1	tous y	tous r	tous r	tous r
	F_2	tous y	9 r	9 r	9 r
			7 y	4 y	4 o
				3 b	3 y
Y2	F_1		tous y	tous r	tous r
	F_2		tous y	9 r	9 r
				4 y	4 y
				3 b	3 o
B	F_1			tous b	tous r
	F_2			tous b	9 r
					4 o
					3 b
O	F_1				tous o
	F_2				tous o

a. Définissez vos propres symboles et donnez les génotypes des quatre lignées pures.

b. Montrez comment les phénotypes F1 et les rapports F2 ont

été obtenus.

c. Etablissez une voie biosynthétique expliquant les résultats génétiques, en indiquant quel gène contrôle quel enzyme.

43. Chez le froment, *Triticum aestivum*, la couleur du grain est due à des gènes dupliqués, dont chacun a un allèle *R* et un allèle *r*. Un nombre quelconque d'allèles *R* donnera un grain rouge, et l'absence complète d'allèle *R* donne un grain blanc. Lors d'un croisement entre une lignée pure rouge et une lignée pure blanche, la F_2 était pour $\frac{63}{64}$ rouge et $\frac{1}{64}$ blanche.

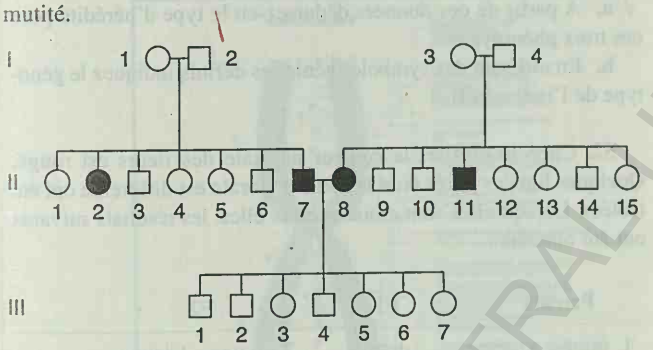
a. Combien de gènes R segrègent-ils dans ce système ?

b. Donnez les génotypes des parents, de la F_1 et de la F_2.

c. Différentes plantes F_2 sont rétrocroisées avec le parent blanc. Donnez des exemples de génotypes qui donneraient dans leur descendance des rapports suivants, (1) 1 rouge : 1 blanc, (2) 3 rouges : 1 blanc, (3) 7 rouges : 1 blanc.

d. Quelle est la formule qui associe en général le nombre de gènes qui ségrègent à la proportion d'individus rouges dans la F_2 de tels systèmes ?

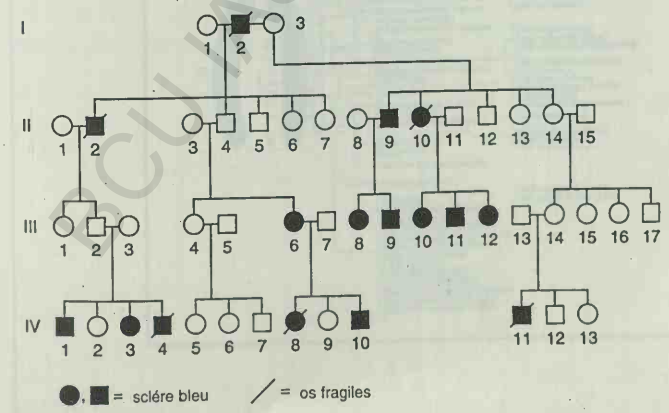
44. L'arbre généalogique suivant montre l'hérédité de la surdimutité.



a. Expliquez l'hérédité de cette état rare dans les deux femelles des générations I et II en donnant les génotypes d'autant individus que possible. Utilisez les symboles de votre choix.

b. Expliquez comment des individus normaux apparaissent à la génération II en vous assurant que votre réponse est compatible avec votre réponse à la partie a.

45. L'arbre généalogique ci-dessous concerne le sclera bleu (excroissance fine bleuâtre de l'oeil) et la fragilité des os :



a. Ces deux anomalies sont-elles dues au même gène ou à des gènes séparés? Donnez clairement les raisons de votre choix.

b. Les gènes sont-ils autosomiques ou liés au sexe ?

c. L'arbre généalogique montre-t-il une quelconque évidence de pénétrance ou d'expressivité incomplètes. Dans ce cas, mesurez en au mieux la portée.

46. Les travailleuses de la lignée d'abeilles dénommée Brown montrent ce que l'on appelle un «comportement hygiénique», c'est-à-dire qu'elles débouchent les compartiments de la niche contenant des pupes mortes, et les en ôtent. Ceci prévient la dispersion de bactéries infectieuses au sein de la colonie. Les travailleuses de la lignée Van Scoy n'accomplissent cependant pas ce genre d'action et cette lignée est dite «non-hygiénique». Lorsqu'une reine de la lignée Brown est croisée avec des abeilles mâles Van Scoy , la F_1 a un comportement non-hygiénique. Lorsque des abeilles mâles F_1 fécondent une reine de la lignée Brown, les comportements suivants sont observés dans la descendance :

$\frac{1}{4}$ hygiénique
$\frac{1}{2}$ débouchage non-suivi d'enlèvement des pupes
$\frac{1}{4}$ non-hygiénique

Cependant, en examinant plus en détail les individus non-hygiéniques, on mit en évidence que si les compartiments contenant des pupes mortes étaient débouchés par l'apiculteur, environ la moitié des individus enlevaient les pupes mortes, alors que l'autre moitié ne le faisait pas.

a. Que proposez-vous comme hypothèse génétique pour expliquer ces types de comportement ?

b. Discutez les données en termes d'épistasie, de dominance et d'interactions dues au milieu.

(NOTE : Les travailleuses sont stériles, et toutes les abeilles d'une même lignée portent les mêmes allèles).

47. Chez une espèce de Drosophila, les ailes sont normalement de forme ronde, mais vous avez obtenu deux lignées pures, l'une pourvue d'ailes de forme ovale et l'autre de forme en faucille. Les résultats suivant ont été observés après croisement entre ces lignées pures :

Parents		F1	
Femelle	Mâle	Femelle	Mâle
en faucille	ronde	en faucille	en faucille
ronde	en faucille	en faucille	ronde
en faucille	ovale	ovale	en faucille

a. Donnez le fondement génétique de ces résultats, en définissant tous les symboles alléliques.

b. Si les femelles F1 de forme ovale du croisement 3 sont croisées avec des mâles F1 de forme ronde du croisement 2 quels rappports phénotypiques sont-ils attendus dans la descendance pour chacun des sexes ?

SCUJASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

48. Chez la souris, une bande jaune est normalement présente sur les poils, mais des variants à deux ou trois bandes sont connus. Un croisement a été opéré entre une souris femelle de type une bande et un mâle à trois bandes (Ni l'un ni l'autre n'était issu d'une lignée pure). Leur descendance a été la suivante :

Femelles : $\frac{1}{2}$ à une bande
$\frac{1}{2}$ à trois bandes

Mâles : $\frac{1}{2}$ à une bande
$\frac{1}{2}$ à trois bandes

a. Donnez une interprétation claire de l'hérédité de ces phénotypes.

b. En appliquant votre modèle, quel serait le résultat d'un croisement entre une souris fille à trois bandes et un mâle à une bande.

49. Chez le vison, le type sauvage possède une fourrure quasi noire. Les éleveurs ont développé de nombreuses races pures de variants de couleur pour l'industrie du manteau de vison. Deux d'entre elles sont la race platine (gris-bleu) et aléoutienne (gris acier). Elles ont été utilisées pour des croisements, aves les résultats suivants :

Croisement	Parents	F1	F2
1	sauvage × platine	sauvage	18 sauvage, 5 platine
2	sauvage × aléoutien	sauvage	27 sauvage, 10 aléoutien
3	platine × aléoutien	sauvage	123 sauvage
			41 platine
			46 aléoutien
			17 saphir (nouvelle couleur)

a. Donnez une interpétation génétique à ces trois croisements. Donnez les génotypes des parents, des F1 et F2 pour les trois croisements et indiquez les allèles de chacun des gènes supposés chez chaque individu.

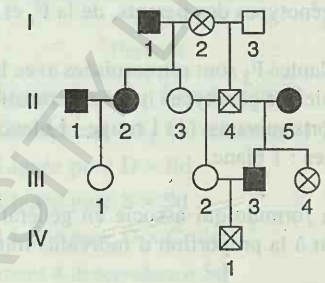
b. Quels sont les rapport phénotypiques en F1 et F2 d'un croisement entre une race pure de couleur saphir et de couleur platine et aléoutienne.

50. Chez la drosophile, un gène autosomique détemine la forme du poil, *B* déterminant un poil droit et *b* un poil courbé. Sur un autre autosome se trouve un allèle dominant *I* qui inhibe la formation des poils de sorte que la mouche est glabre (*i* n'a pas d'effet phénotypique).

a. Si un individu à poils droits de race pure est croisée avec une mouche dont le caractère glabre est du à l'inhibition du génotype "poil courbé", quels seront les génotypes de la F1 et de la F2 ?

b. Quel croisement donnerait-il le rapport 4 glabre : 3 droit : 1 courbé ?

51. Le pédigré suivant a trait aux phénotypes de l'oeil chez les coléoptères du genre *Tribolium*. Le symbole noir représente des yeux noirs, le symbole blanc des yeux bruns et la croix symbolise le phénotype "dépourvu d'yeux".



a. A partir de ces données déduisez-en le type d'hérédité pour ces trois phénotypes.

b. En utilisant des symboles géniques définis indiquez le génotype de l'individu II-3.

52. Chez le muflier la couleur normale des fleurs est rouge. Quelques lignées pures dont la couleur florale est différente ont été isolées. Lorsqu'elles sont croisées entre elles, les résultats suivants ont été obtenus :

Parents	F1	F2
1. orange × jaune	orange	3 orange : 1 jaune
2. rouge × orange	rouge	3 rouge : 1 orange
3. rouge × jaune	rouge	3 rouge : 1 jaune
4. rouge × blanc	rouge	3 rouge : 1 blanc
5. jaune × blanc	rouge	9 rouge : 3 jaune : 4 blanc
6. orange × blanc	rouge	9 rouge : 3 orange : 4 blanc
7. rouge × blanc	rouge	9 rouge : 3 jaune : 4 blanc

a. Expliquez l'hérédité de ces couleurs .

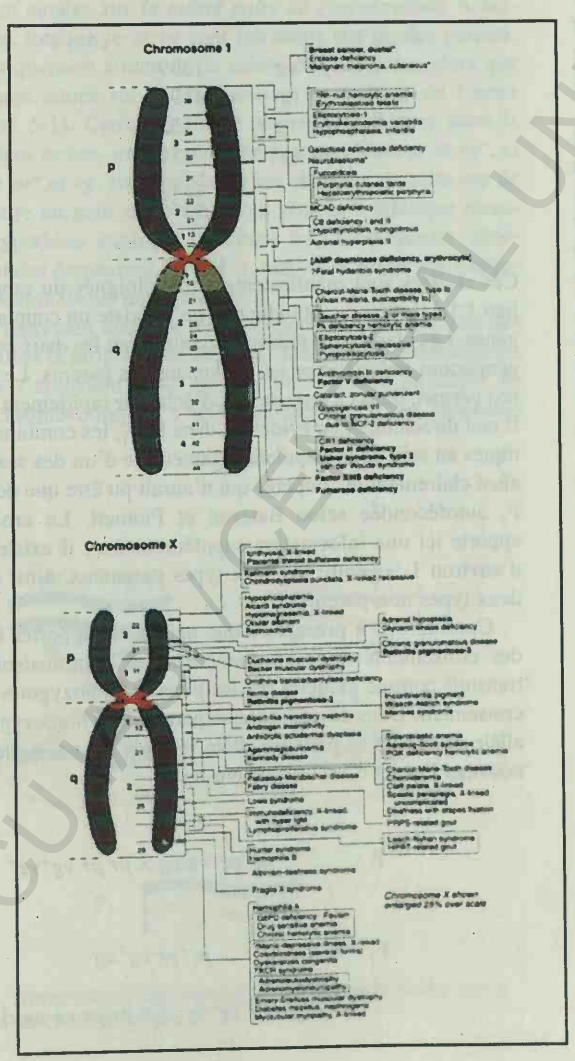
b. Ecrivez les génotypes des parents, de la F1 et de la F2.

BCU IAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

5

Liaison génétique (Linkage) I : Les bases de l'établissement de cartes chromosomiques chez les eucaryotes



Carte du chromosome 1 et du chromosome X l'homme. Les gènes ont été localisés grâce à plusieurs techniques, y compris celles traitées dans ce chapitre et dans le suivant (extrait du *Journal of NIH Research*, 1992).

CONCEPTS-CLÉS

- Deux gènes proches l'un de l'autre sur le même chromosome ne ségrègent pas indépendamment à la méiose
- La recombinaison conduit à des génotypes caractérisés par de nouvelles combinaisons des allèles parentaux
- Une paire de chromosomes homologues est susceptible d'échanger des fragments chromosomiques au cours d'un processus appelé crossing-over (terminologie anglaise)
- La recombinaison peut se réaliser soit par assortiment indépendant, soit par crossing-over
- La position des loci occupés par les gènes sur un chromosome peut être établie en mesurant la fréquence des recombinants dus aux crossing-over.
- Les distances entre loci établies en mesurant la recombinaison sont quasi additives.
- La survenance d'un crossing-over peut influencer celle d'un second crossing-over dans une région adjacente.

BCU LAUSANNE - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Nous avons déjà établi les principes fondamentaux de la ségrégation et de l'assortiment, et nous les avons associés au comportement des chromosomes au cours de la méiose. Ainsi, à partir du croisement *AaBb* × *AaBb*, nous nous attendons à un rapport phénotypique de 9 : 3 : 3 : 1. Comme nous l'avons appris par l'étude de Bridges sur la non-disjonction (page ..), des exceptions aux prédictions mendéliennes simples peuvent conduire le chercheur à de nouvelles découvertes. C'est une exception de ce type dans le cas d'un croisement dihybride qui a précisément fourni l'indice qui a permis de déboucher sur les concepts importants présentés dans ce chapitre.

Message Dans le domaine de l'analyse génétique, les exceptions au comportement prédit sont souvent à la base de concepts nouveaux et fondamentaux.

La découverte du linkage

Au début de ce siècle, William Bateson and R.C. Punnett étudiaient l'hérédité chez le pois de senteur, et en particulier, celle de deux paires de gènes : l'un affectant la couleur de la fleur (*P*, pourpre, et *p*, rouge), l'autre affectant la forme des grains de pollen (*L*, long et *l*, rond). Ils effectuèrent alors un croisement dihybride, *PPLL* (pourpre, long) × *ppll* (rouge, rond), et autofécondèrent la F_1 *PpLl* hétérozygote pour obtenir la F_2. Le tableau 5-1 montre les proportions de chaque phénotype en F_2.

Les rapports entre phénotypes F_2 s'écartent fortement du rapport 9:3:3:1 attendu. Que se passe-t-il ? Une interprétation basée sur un rapport mendélien modifié ne semble pas concevable. Il faut souligner que deux classes phénotypiques sont plus représentées que prévu : celle du phénotype pourpre, long, et celle du phénotype rouge, rond. Bateson et Punnett suggérèrent que la taille de ces deux classes serait due à un excès des deux types gamétiques *PL* et *pl*. Etant donné que ceux-ci sont les types gamétiques parentaux de départ, les deux chercheurs pensèrent qu'un **couplage** physique entre les gènes dominants (*P* et *L*) et entre les gènes récessifs (*p* et *l*) empêchait leur assortiment indépendant dans la F_1. Cependant, ils ignoraient la nature exacte d'un tel couplage.

Tableau 5-1. Phénotypes observés dans la F_2 chez le pois de senteur par Bateson et Punnet

Phénotype (et génotype)	Nombre d'individus observés	Nombre d'individus attendus sur la base du rapport 9:3:3:1.
Pourpre, long (*P-L-*)	4831	3911
Pourpre, rond (*P-ll*)	390	1303
Rouge, long (*ppL-*)	393	1303
Rouge, rond (*ppll*)	1338	435
	6952	6952

La confirmation des résultats obtenus par Bateson et Punnett dut attendre le développement de la Drosophile en tant qu'outil génétique. Suite à la description de ce couplage, Thomas Hunt Morgan mit en évidence une déviation similaire par rapport à la seconde loi de Mendel, en étudiant deux paires de gènes autosomiques chez la Drosophile. Une de ces paires affecte la couleur des yeux (*pr*, pourpre, et pr^+, rouge), l'autre affecte la longueur des ailes (*vg*, vestigiale, et vg^+, normale). Morgan croisa des mouches *prpr vgvg* avec des mouches pr^+pr^+ vg^+vg^+, et ensuite croisa les femelles double hétérozygotes avec des mâles de type parental *prpr vgvg* (croisement-test) : pr^+pr vg^+vg ♀ × *prpr vgvg* ♂.

L'utilisation du croisement-test (ou test-cross) est très importante. Etant donné qu'un des parents (le testeur) ne produit que des gamètes portant les allèles récessifs, le phénotype des descendants du croisement traduit la contribution gamétique de l'autre parent double hétérozygote. De la sorte, le chercheur peut se concentrer sur une méiose et ne pas tenir compte de l'autre. Ceci est à opposer à ce qui se produit dans une F_1 autofécondée, où deux séries de divisions méiotiques sont à considérer : une pour les gamètes parentaux mâles, et une pour les gamètes parentaux femelles. Voici les résultats obtenus par Morgan; les individus F_2 y sont désignés selon les gènes issus de la femelle F_1 :

pr^+vg^+	1339
pr vg	1195
pr^+vg	151
pr vg^+	154
	2839

Ces chiffres sont manifestement très éloignés du rapport mendélien 1:1:1:1 attendu, et indiquent qu'il existe un couplage entre ces gènes. Les classes les plus importantes sont les deux combinaisons génétiques pr^+vg^+ et *pr vg*, provenant des parents. Le croisement-test permet, dans ce type de cas, d'éclaircir rapidement la situation. Il met directement en évidence, dans la F_1, les combinaisons génétiques au sein de la population gamétique d'un des sexes, révélant ainsi clairement le couplage qui n'aurait pu être que déduit dans la F_1 autofécondée selon Bateson et Punnett. Le croisement-test apporte ici une information supplémentaire : il existe un rapport d'environ 1 : 1 entre les deux types parentaux, ainsi qu'entre les deux types non-parentaux.

Considérons à présent ce que peut nous apporter la répétition des croisements mais en changeant les combinaisons d'allèles transmis comme gamètes par les parents homozygotes du premier croisement. Dans ce cas, chaque parent était homozygote pour un allèle dominant et pour un allèle récessif. Les femelles F_1 font à nouveau l'objet d'un croisement-test:

P pr^+pr^+vg vg × *pr pr* vg^+vg^+

↓

F_1 pr^+pr vg^+vg

pr^+pr vg^+vg ♀ × *pr pr vg vg* ♂

La descendance suivante fut obtenue suite au croisement-test :

pr^+vg^+	157
pr vg	146
pr^+vg	965
$pr\ vg^+$	1067
	2335

A nouveau, ces résultats sont fort différents du rapport 1:1:1:1 attendu. Cependant, les deux classes les plus importantes sont cette fois celles possédant l'un ou l'autre des gènes dominants, plutôt que comme précédemment, deux dominants ou deux récessifs. Mais il faut souligner qu'une fois encore, les combinaisons génétiques transmises à la F_1 par les parents, constituent les classes les plus fréquentes de la F_2. Bateson et Punnett utilisèrent le mot **répulsion** pour décrire cette situation, parce qu'il leur semblait que dans ce cas les gènes dominants non-alléliques s'excluaient l'un l'autre - à l'opposé de la situation de couplage, où les gènes dominants semblaient être associés l'un à l'autre. Comment pourrions-nous expliquer ces ceux phénomènes : couplage et répulsion ?

Morgan suggéra que les deux paires de gènes étudiées lors du couplage sont situées *sur la même paire de chromosomes homologues*. Ainsi, lorsque *pr* et *vg* sont introduits par un des parents, ils sont physiquement situés sur le même chromosome, alors que pr^+ et vg^+ sont situés sur le chromosome homologue de l'autre parent (figure 5-1). Cette hypothèse permet d'expliquer aussi la répulsion. Dans ce cas, un chromosome parental porte *pr* et vg^+, et l'autre porte pr^+ et *vg*. La répulsion n'est alors qu'un autre cas de couplage, entre un gène dominant et un gène non-allélique récessif. Cette hypothèse explique comment les combinaisons génétiques parentales demeurent associées, mais n'éclaircit pas l'apparition des combinaisons non-parentales.

Morgan, reprenant une idée du cytologue Janssens avancée dès 1909, émit alors la proposition suivante : lorsque les chromosomes homologues s'associent à la méiose, un échange physique de morceaux chromosomiques s'opère parfois selon un processus

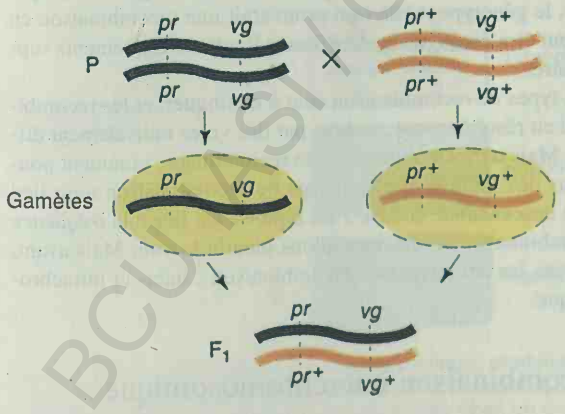


Figure 5-1. Transmission de deux couples d'allèles situés sur la même paire de chromosomes.

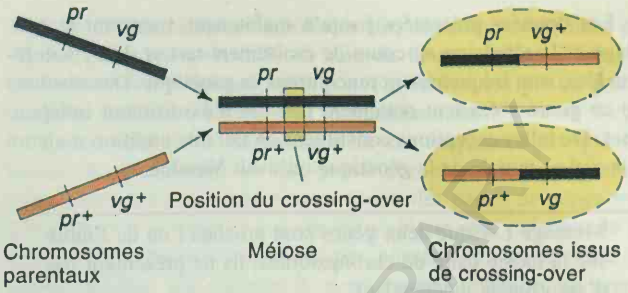


Figure 5-2. Crossing-over durant la méiose. Un individu recoit un homologue de chaque parent . L'échange de segments par crossing-over peut donner lieu à des chromosomes gamétiques dont la combinaison des allèles diffère de celle des parents

dénommé»crossing-over». La figure 5-2 illustre ce processus, dont résulte un échange physique de fragments de chromosomes. L'arrangement initial des gènes sur les deux chromosomes est appelé combinaison **parentale**. Les deux nouvelles combinaisons sont appelées **types dus au crossing-over** ou plus simplement, **recombinants**.

Cette hypothèse peut apparaître un peu extravagante. Existe-t-il un processus cytologiquement observable qui pourrait témoigner d'un mécanisme comme le crossing-over ? Nous avons vu au cours du chapitre 3 que durant la méiose, lorsque les chromosomes dupliqués s'apparient entre eux, deux chromatides semblent souvent se croiser, contrairement aux deux autres chromatides. Ceci est représenté dans la figure 5-3. Rappelons que la structure en croix qui en résulte s'appelle un chiasma. Pour Morgan, comme pour Janssens, l'apparition de ces chiasmas était une confirmation visuelle parfaite du concept de crossing-over. (Notons qu'ils semblent indiquer que les crossing-over se produisent entre chromatides, et non entre chromosomes non-dupliqués. Nous y reviendrons plus loin.) Jusqu'à présent, acceptons l'interprétation de Morgan selon laquelle les chiasmas sont la contrepartie cytologique des crossing-over, et laissons-en la démonstration pour le chapitre 20. Retenons cependant que l'interprétation de Morgan n'était pas abstraite; il cherchait une explication *physique* et concrète à ses résultats *génétiques*. Le fait qu'il ait par la suite réussi à corréler les résultats de croisements génétiques avec des phénomènes cytologiques souligne bien l'importance de la théorie chromosomique comme base de recherche.

Message Les chiasmas sont les manifestations visibles des crossing-over.

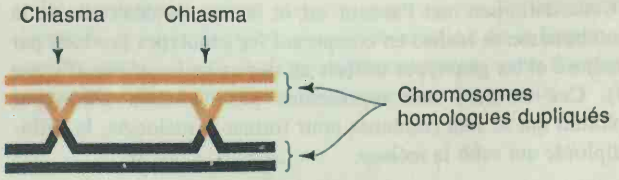


Figure 5-3. Diagramme de la formation de chiasmas à la méiose. Chaque droite représente une chromatide appartenant à une paire de chromosomes en cours de synapsis.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Les données présentées jusqu'à maintenant, montrant le couplage et la répulsion au cours de croisement-test et de F_1 autofécondées, sont fréquemment rencontrées en génétique. Des résultats de ce genre s'écartent nettement des cas d'assortiment indépendant. De telles exceptions constituent en fait une addition majeure à la vision initiale de la génétique qu'avait Mendel.

Message lorsque deux gènes sont proches l'un de l'autre sur la même paire de chromosomes, ils ne présentent pas d'assortiment indépendant.

La situation où des gènes se trouvent sur le même chromosome est appelée «linkage» ou **liaison**. Deux gènes situés sur le même chromosome sont dits *liés*. On peut aussi parler de la liaison entre allèles spécifiques : par exemple, dans un individu *AaBb*, *A* pourrait être lié à *b*; *a* devrait alors nécessairement être lié à *B*. Ces termes se réfèrent à l'existence d'une entité physique reliant les gènes entre eux, c'est-à-dire, au chromosome lui-même ! Vous pourriez vous poser la question : pourquoi parler de liaison plutôt que de couplage entre gènes ? La raison en est que les termes couplage et répulsion sont à présent utilisés pour désigner deux formes de liaison différentes chez un double hétérozygote :

Situation de couplage : $\frac{pr \quad vg}{pr^+ \quad vg^+}$

Situation de répulsion : $\frac{pr \quad vg^+}{pr^+ \quad vg}$

Autrement dit, le couplage fait référence à la liaison de deux gènes, dominants ou récessifs, alors que la répulsion indique la liaison d'allèles dominants avec des allèles récessifs. Un cas de couplage ou de répulsion ne peut être identifié chez un double hétérozygote qu'en réalisant un croisement-test, ou en considérant les génotypes parentaux.

La recombinaison

Nous avons déjà introduit le terme recombinaison. Ce terme est largement utilisé en génétique théorique et appliquée, de sorte qu'il s'avère nécessaire de le définir clairement à ce niveau. La recombinaison peut se produire, outre à la méiose, dans un certain nombre de situations, mais nous ne la définirons pour l'instant que dans le cadre méiotique. La recombinaison méiotique est tout processus qui génère un produit haploïde présentant un génotype différent des deux génotypes haploïdes qui constituent la cellule diploïde méiotique. Le produit de la méiose ainsi obtenu est appelé un **recombinant**.

Cette définition met l'accent sur le fait que la détection de la recombinaison se réalise en comparant les génotypes produits par la méiose et les génotypes utilisés au départ de la méiose (Figure 5-4). Ces derniers sont représentés par les deux génotypes haploïdes qui se sont combinés pour former le méiocyte, la cellule diploïde qui subit la méiose.

Message Au cours de la méiose, la recombinaison donne lieu à des génotypes hybrides qui diffèrent des génotypes hybrides parentaux.

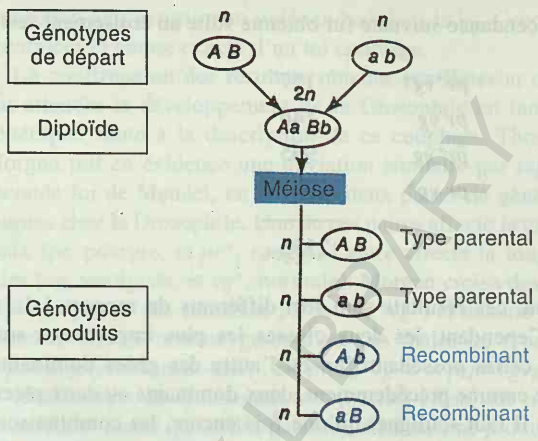


Figure 5-4. Les recombinants sont ces produits de la méiose dont les combinaisons d'allèles diffèrent de celles de cellules haploïdes produites lors de la méiose.

La définition de la recombinaison s'applique aussi bien aux cycles de vie diploïdes qu'haploïdes; cependant, la détection des recombinants en phase haploïde est aisée alors qu'elle est plus laborieuse au cours de la phase diploïde. Les haploïdes engagés dans une méiose ou produits par elle. représentent des génotypes individuels, qui peuvent donc être déterminés directement à partir de leur phénotype. La figure 5-4 tente de résumer comment des recombinants peuvent être aisément identifiés au cours du cycle de vie haploïde. Puisque les gamètes de départ doivent être connus pour détecter les recombinants au cours du cycle diploïde, il est préférable d'utiliser comme parents des lignées pures. De plus, nous ne pouvons détecter directement les recombinants parmi les gamètes résultants : nous devons réaliser un croisement-test avec le diploïde méiotique étudié afin de révéler les recombinants produits par la méiose. S'il est démontré qu'un descendant du croisement-test est issu d'un recombinant de la méiose initiale, il est également appelé recombinant. Il faut à nouveau souligner l'utilité du croisement-test, qui nous permet de nous concentrer sur *un* seul système méiotique, et d'éviter ainsi toute ambiguïté. Par contre, parmi les descendants d'une F_1 autofécondée (figure 5-5), par exemple, le génotype *AABb* (qui prouverait une recombinaison en F_1) ne peut être distingué de *AABB* sans l'aide de croisements supplémentaires.

Deux types de recombinaison sont à distinguer, et les recombinants qui en résultent sont produits par des voies radicalement différentes. Mais un recombinant est un recombinant : comment pouvons-nous dès lors décider quel type de recombinaison a eu lieu dans une descendance donnée ? La réponse est liée à la *fréquence* des recombinants, comme nous allons bientôt le voir. Mais avant, considérons les deux types de recombinaison : inter- et intrachromosomique.

La recombinaison interchromosomique

La recombinaison interchromosomique est obtenue par l'assortiment mendélien indépendant (figure 5-6). Dans un croisement-test, les deux classes de recombinants constituent toujours

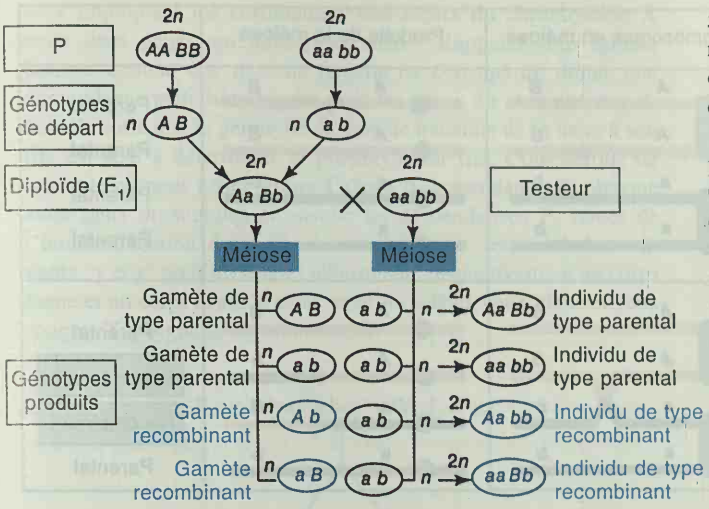


Figure 5-5. Détection de la recombinaison chez les organismes diploïdes. La figure 5-4 fait d'ailleurs partie en fait de cette figure-ci. Chez les diploïdes, les produits recombinants issus de la méiose sont plus facilement identifiés par le croisement d'un hétérozygote avec le testeur récessif.

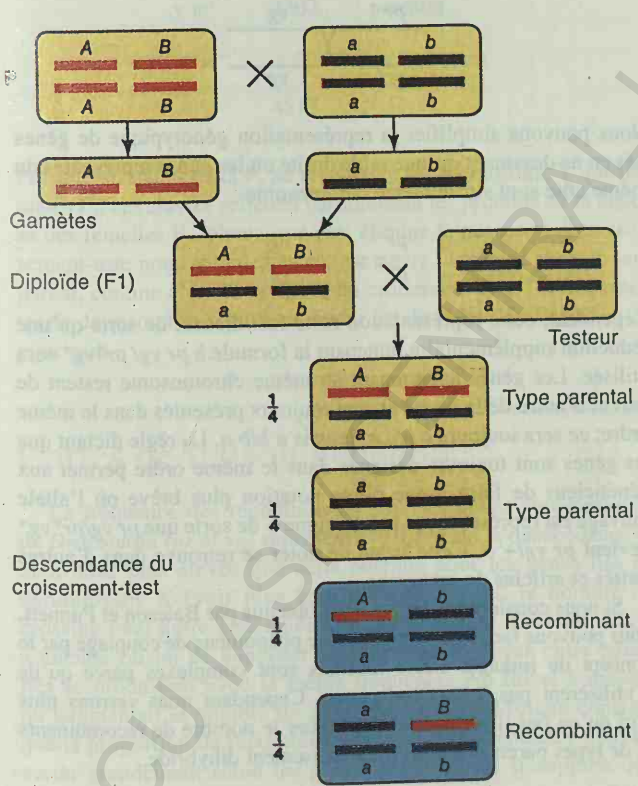


Figure 5-6. Recombinaison interchromosomique, produisant toujours une fréquence de recombinants de 50 pour cent. Ce diagramme montre deux paires de chromosomes chez un organisme diploïde avec *A* et *a* sur l'une des paires et *B* et *b* sur l'autre. Notez que nous pourrions représenter la situation haploïde en éliminant les cases marqués par P et le croisement-test.

50% de la descendance; autrement dit, chaque recombinant est représenté à raison de 25% au sein de la descendance. Si nous observons cette fréquence, nous pouvons en déduire que les paires de gènes étudiées s'assortissent indépendamment.

L'interprétation la plus simple de ces fréquences est que les paires de gènes sont sur des paires chromosomiques séparées. Cependant, comme suggéré auparavant, des paires de gènes très éloignées sur la même paire chromosomique sont capables de se comporter indépendamment, et par conséquent, de produire le même résultat. Au chapitre 6, nous verrons comment un grand nombre de crossing-over sont susceptibles de briser la liaison entre paires de gènes éloignés.

La recombinaison intrachromosomique

La recombinaison intrachromosomique est produite par le crossing-over. Ceux-ci peuvent se produire entre n'importe lesquelles des deux chromatides non-soeurs (nous le prouverons au chapitre 6). Il est évident qu'un crossing-over entre deux loci ne se produit pas à chaque méiose, mais s'il a lieu, la moitié des produits de cette méiose seront des recombinants, comme le montre la figure 5-7. Les méioses sans crossing-over entre les loci concernés ne produisent que les génotypes parentaux pour ces paires de gènes.

Une recombinaison intrachromosomique est reconnue par sa fréquence de recombinants inférieure à 50%. La liaison physique des combinaisons de gènes parentales empêche leur assortiment indépendant (figure 5-8). L'exemple d'une telle situation se rencontre dans les données de Morgan (page ...), où la fréquence de recombinaison était de (151 + 154)/2839 = 10,7 pour cent. Cette valeur est très inférieure aux 50% correspondant à l'assortiment indépendant. Qu'en est-il des fréquences de recombinaison supérieures à 50%? Comme nous le prouverons au chapitre 6, de telles fréquences ne sont en fait *jamais* observées.

Notez dans la figure 5-7 qu'un crossing-over donne lieu à deux produits réciproques, ce qui explique pourquoi les classes réciproques de recombinants sont approximativement de fréquences égales.

Message Une fréquence de recombinaison inférieur à 50 pour cent indique que les gènes en cause sont liés. Une fréquence de recombinaison de 50% signifie assez souvent que les gènes sont non-liés et situés sur des chromosomes distincts.

La suite de ce chapitre a trait à la recombinaison intrachromosomique et aux crossing-over qui la cause.

Liaison génétique et symboles

Le symbolisme utilisé jusqu'ici pour décrire les croisements s'alourdit considérablement avec l'introduction de la liaison. La constitution génétique de chaque chromosome au cours d'un croisement chez *Drosophila* peut se représenter comme suit:

$$\frac{pr \quad vg}{pr^{+} \quad vg^{+}}$$

Chaque droite représente un chromosome, les gènes du dessus appartenant à un chromosome, et ceux du dessous appartenant à

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

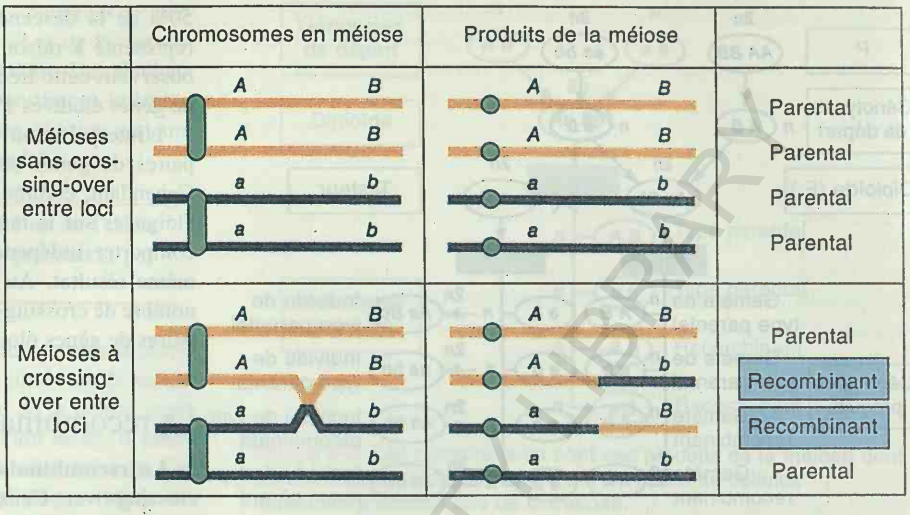
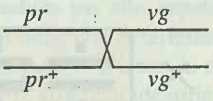


Figure 5-7. Recombinants intrachromosomiques issus des meïoses au sein desquelles les chromatides non-soeurs participent à un crossing-over entre les gènes en cause.

l'autre. Un crossing-over est désigné par un X entre les deux chromosomes, de sorte que

$$\frac{pr \quad vg}{pr^+ \quad vg^+}$$

équivaut à



Nous pouvons simplifier la représentation génotypique de gènes liés en ne dessinant qu'une seule droite où les gènes représentés du même côté sont sur le même chromosome :

$$\frac{pr \quad vg}{pr^+ \quad vg^+}$$

Cependant, cette représentation reste fastidieuse, de sorte qu'une réduction supplémentaire ramenant la formule à *pr vg/ pr*$^+$*vg*$^+$ sera utilisée. Les gènes appartenant au même chromosome restent de part et d'autre de la droite et sont toujours présentés dans le même ordre; ce sera toujours *a b/a b*, jamais *a b/b a*. La règle dictant que les gènes sont toujours désignés dans le même ordre permet aux généticiens de faire usage d'une notation plus brève où l'allèle sauvage est représenté par le seul signe + de sorte que *pr vg/pr*$^+$*vg*$^+$ devient *pr vg/+ +*. Cette façon de noter se retrouve dans d'autres traités et articles de recherche.

Si nous considérons les résultats obtenus par Bateson et Punnett, nous pouvons facilement expliquer le phénomène de couplage par le concept de linkage. Leurs résultats sont complexes parce qu'ils n'utilisèrent pas le croisement-test. Cependant nous verrons plus tard qu'en fait il est possible d'estimer le nombre de recombinants et de types parentaux issus d'un croisement dihybride.

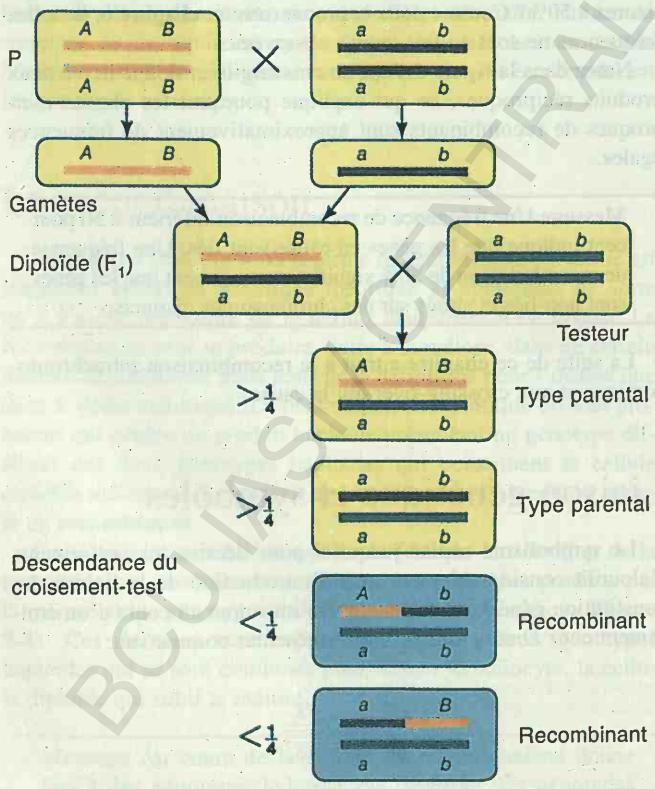


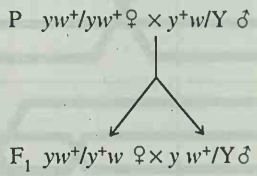
Figure 5-8. Recombinaison intrachromosomique, produisant toujours une fréquence de recombinants inférieure à 50 pour cent.

Liaison des gènes sur le chromosome X

Jusqu'à présent, nous avons considéré la recombinaison entre gènes autosomiques. Quels sont les conséquences d'un crossing-

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

over impliquant les chromatides non-soeurs du chromosome X entre deux gènes qui nous intéressent ? Rappelez-vous qu'une femme, comme une mouche femelle de *Drosophila*, donne une descendance mâle hémizygote pour les gènes du chromosome X, de telle sorte que le génotype du gamète transmis de la mère à son fils est seul à déterminer le phénotype du fils. Considérons un exemple où nous observerons d'abord la descendance F_1 obtenue entre deux drosophiles et ensuite les descendances F_2 issues de l'interfécondation de la F_1. Nous utiliserons les symboles suivants : y et y^+ pour les allèles déterminant respectivement un corps jaune et un corps brun; w et w^+ pour les allèles yeux bleus et yeux rouges; Y désigne le chromosome Y.



Le nombre de mâles en F_2 pour chaque classe phénotypique est

y w	43	recombinant
y^+ *w*	2146	parental
y w^+	2302	parental
y^+ w^+	22	recombinant
	4513	

Puisque les mâles de la F_2 ne récupèrent le chromosome Y que des mâles F_1, ces classes reflètent parfaitement les produits de la méiose des femelles F_1. Notez que ceci élimine la nécessité d'un croisement-test; nous sommes en état de suivre la méiose chez un seul parent, comme c'est le cas pour un croisement-test. La fréquence totale de recombinaison dans ce cas est de (43 + 22) / 4513 = 1,4 pour cent.

Cartes de liaison génétique

La fréquence des recombinants pour les gènes autosomiques de *Drosophila* (*pr* et *vg*) représentait 10,7 % de la descendance et était donc plus élevée que celle obtenue pour les gènes liés au chromosome X (voir plus haut). Apparemment, le nombre de crossing-over entre gènes liés n'est pas constant. En effet, il n'y a aucune raison de supposer que les crossing-over entre gènes liés se produisent avec la même fréquence. Au fur et à mesure qu'augmentait le nombre de gènes liés étudiés, Morgan constata que la proportion de recombinants parmi la descendance pouvait varier grandement selon les gènes liés étudiées. Il supposa que ces variations de fréquence de crossing-over pourraient refléter les distances réelles séparant les gènes sur les chromosomes. Morgan délégua l'étude de ce problème à un étudiant, Alfred Sturtevant, qui (comme Bridges) devint un généticien réputé. Morgan demanda à Sturtevant, encore étudiant en candidature à l'époque, de trouver un fil conducteur aux données sur les crossing-over entre les différents gènes liés. En une nuit, Sturtevant développa une méthode décrivant les relations entre gènes, qui est encore utilisée aujourd'hui.

Selon ses propres mots, «A la fin de 1911, suite à une conversation avec Morgan, je réalisai soudainement que les variations dans l'importance du linkage, déjà attribuées par Morgan aux différences de distance entre gènes, m'offrirait la possibilité de déterminer de façon linéaire des séquences le long du chromosome. Je rentrai chez moi et consacrai la majeure partie de la nuit (en négligeant le travail à domicile à accomplir en tant que bachelier) à établir la première carte chromosomique.

Dans la logique de Sturtevant, considérons un croisement-test donnant les résultats suivants :

pr vg / pr vg	165	types parentaux
pr^+ vg^+ / *pr vg*	191	(sans crossing-over)
pr vg^+ / *pr vg*	23	types recombinants
pr^+ *vg* / *pr vg*	21	(dus aux crossing-over)
	400	

La descendance dans cet exemple représente 400 gamètes femelles, parmi lesquels 44 (11 pour cent) sont recombinants. Sturtevant suggéra que ce pourcentage de recombinants soit utilisé en tant que mesure de la distance linéaire séparant deux gènes sur une **carte génétique**, ou **carte de linkage**.

L'idée de base est relativement simple. Imaginons deux paires de gènes données, séparées par une distance fixe. Supposons ensuite qu'un certain nombre de crossing-over se produisent au hasard au niveau des homologues appariés. Au cours de la méiose, un crossing-over se produit par hasard dans la région chromosomique séparant ces deux paires de gènes; de ces méioses, sont issus des recombinants. Au cours d'autres méioses, aucun crossing-over ne se produit dans la zone considérée et donc aucun recombinant ne sera produit par ces méioses. Sturtevant postula alors l'existence d'une proportionnalité approximative: plus la distance séparant les gènes liés est grande, plus la probabilité qu'un crossing-over s'y produise est élevée, et partant, plus la proportion de méioses au cours desquelles un crossing-over s'y produira sera grande. De la sorte, en établissant la fréquence des recombinants, nous pouvons déduire une mesure de la distance séparant les paires de gènes (Figure 5-9). Nous pouvons définir une **unité de carte génétique** (**U.C.**) comme la distance entre gènes pour laquelle un produit sur 100 de la méiose est un recombinant. Autrement dit, une **fréquence de recombinaison** (**F.R.**) de 0,01 (ou 1 pour cent) est définie comme 1 U.C. (Cette unité est parfois appelée un **centimorgan** (**cM**), en l'honneur de Thomas Hunt Morgan).

Une conséquence directe de cette relation est que si les gènes *A* et *B* sont séparés par 5 unités cartographiques (U.C.), et les gènes *A* et *C* par 3 U.C., alors *B* et *C* devraient être séparés par 8 ou par 2 U.C. (Figure 5-10). Sturtevant découvrit que ceci se produisait effectivement, et son analyse suggère fortement que les gènes sont arrangés linéairement sur leur chromosome.

La place occupée par un gène sur la carte génétique - et sur le chromosome - est appelée **locus du gène** (au pluriel, **loci**). Le locus du gène codant pour la couleur des yeux, et le locus du gène codant pour la longueur des ailes, par exemple, sont sépa-

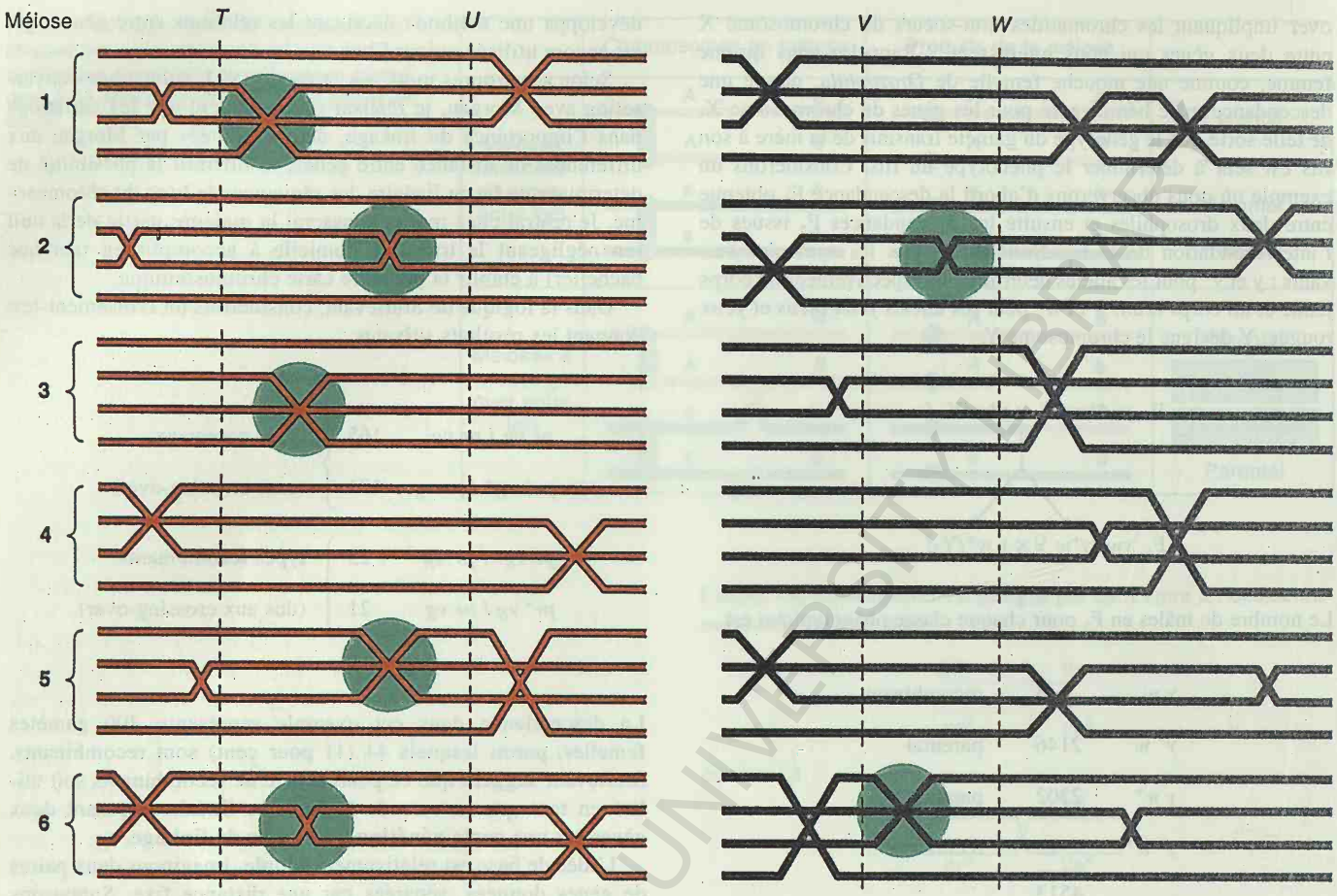


Figure 5-9. Relation entre distance chromosomique et fréquence de recombinaison. A la méiose les enjambements se produisent au hasard le long des chromosomes. Les deux gènes *T* et *U* sont plus éloignés l'un de l'autre que *V* et *W*. Il y a plus de crossing-over entre les chromatides à la méiose entre *T* et *U* qu' entre *V* et *W*, de sorte que la fréquence de recombinaison est plus grande entre *T* et *U* qu' entre *V* et *W*. Comme nous l'allons apprendre plus tard dans ce chapitre un crossing-over peut se produire entre n'importe quelle paire de chromatides non-soeurs.

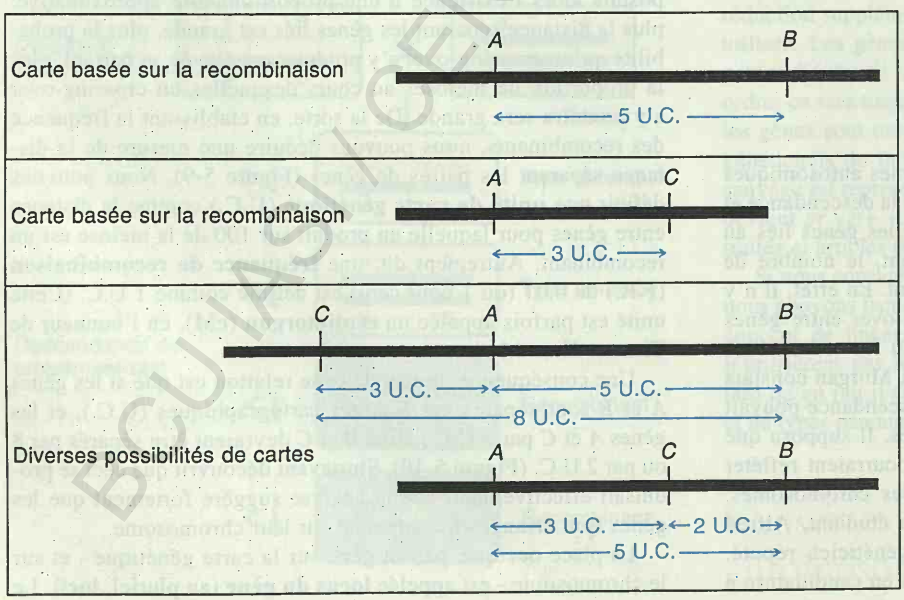
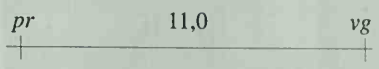


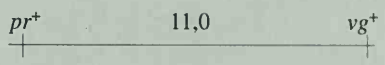
Figure 5-10. Puisque les distances sur la carte sont additives, le calcul des distances *A-B* et *A-C* nous laissent les deux possibilités indiquées en ce qui concerne la distance *B-C*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

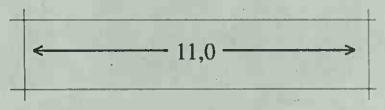
rés par 11 U.C. Ils sont habituellement schématisés comme suit :



encore qu'ils pourraient être aussi bien représentés comme ceci :



ou comme ceci



locus du gène déterminant la couleur des yeux

locus du gène déterminant la longueur des ailes

Le locus de ce gène codant pour la couleur des yeux est habituellement noté en abrégé d'après le premier allèle non-sauvage découvert, mais représente en fait la place sur le chromosome où se situe n'importe quel allèle du même gène.

A partir d'une distance génétique donnée (en U.C.), nous pouvons prédire les fréquences des descendants pour chaque classe. Par exemple, la descendance du croisement-test d'un *pr vg*/++ hétérozygote se répartira comme suit : 5 $\frac{1}{2}$ pour cent sera *pr* + /*pr vg*, et 5 $\frac{1}{2}$ pour cent sera + *vg*/*pr vg*; la descendance du croisement-test d'un *pr* + / + *vg* hétérozygote se répartira comme suit : 5 $\frac{1}{2}$ pour cent sera *pr vg*/*pr vg*, et 5 $\frac{1}{2}$ pour cent sera ++/*pr vg*.

Il y a de fortes chances pour que la «distance» représentée sur une carte génétique corresponde à une distance physique sur le chromosome, et Morgan et Sturtevant voulaient très certainement le suggérer. Cependant, nous devons bien réaliser que la carte génétique est un autre exemple d'entité créée sur la seule base de l'analyse génétique. La carte génétique aurait pu être déduite même en ignorant l'existence des chromosomes. De plus, à ce niveau de la discussion, nous ne pouvons dire si les figures calculées à partir des fréquences de recombinaison reflètent de quelque manière que ce soit les distances physiques réelles sur les chromosomes, malgré le fait que les analyses cytogénétiques effectuées chez *Drosophila* aient montré que les distances génétiques étaient approximativement proportionnelles aux distances chromosomiques. Néanmoins, il doit être souligné que la structure hypothétique (la carte de linkage) a été développée par rapport à une structure très réelle (le chromosome). Autrement dit, la théorie chromosomique a fourni le cadre pour l'établissement des cartes de liaisons génétiques.

Message La fréquence de recombinaison entre gènes liés peut être utilisée pour établir la distance qui les sépare sur le chromosome. L'unité de cartographie (1 u.c.) se définit comme une fréquence de recombinaison de 1 pour cent.

Le niveau d'analyse que nous avons atteint est bien illustré par les cartes de liaison de la lucilie bouchère (*Cochliomyia hominivorax*). Le stade larve de cet insecte parasite les blessures de mammifères et représente donc une peste dommageable pour le bétail dans certaines parties du monde. Un système génétique de contrôle des populations a donc été proposé, du type qui s'était avéré convenir pour d'autres insectes. Ceci ne peut s'accomplir qu'en disposant d'une connaissance génétique de base de l'insecte, et notamment l'établissment d'une carte des chromosomes. Cet insecte a six paires de chromosomes et la cartographie a été récemment entreprise.

Le travail débute par l'obtention et l'analyse d'autant de variants phénotypiques que possible. Le stade adulte de cet insecte est une mouche, et les généticiens ont trouvé des variants chez ces lucilies bouchères. Ils trouvèrent des mouches de six couleurs d'yeux, toutes différentes de la couleur brune des yeux du type sauvage, comme montré dans la Figure 5-11a, ainsi que cinq variants phénotypiques pour d'autres caractères. Onze allèles mutants ont été idenditifés comme responsable des 11 variants phénotypiques, chacun d'entre eux à un locus autosomique différent. Des lignées pures de chaque phénotype ont été interfécondées pour produire des dihybrides F_1 et ceux-ci furent soumises à un croisement-test. Celui-ci mit en évidence un ensemble de quatre groupes de linkage (Figure 5-11b). Notez que les loci *ye* et *lw* sont présentés comme liés quoique la fréquence de recombinaison ne soit pas significativement différente de 50 pour cent.

Une analyse de ce type ne peut attribuer des groupes de linkage à des chromosomes spécifiques; ceci nécessite la mise en oeuvre de techniques cytogénétiques que nous discuterons au chapitre 8. Dans cet exemple-ci, ces méthodes ont effectivement permis d'associer les groupes de liaison avec les chromosomes numérotés comme sur la figure.

Croisements-test impliquant trois gènes liés (Croisement à trois facteurs)

Jusqu'ici nous avons considéré la liaison à l'occasion de croisements entre doubles hétérozygotes et doubles récessifs. Le niveau de complexité suivant consiste à effectuer le croisement entre un triple hétérozygote et un triple récessif. Ce type de croisement, appelé **croisement-test impliquant trois gènes liés**, est une bonne illustration du type d'approche standard utilisée pour l'analyse du linkage. Nous allons maintenant considérer deux exemples de tels croisements.

Nous allons utiliser *Drosophila*, et les allèles non-sauvages *sc* (scute, ou perte de certaines soies thoraciques), *ec* (echinus, ou surface oculaire rugueuse), et *vg* (aile vestigiale). En prenant d'une part *sc*/*sc*, *ec*/*ec*, *vg*/*vg* (triple récessif) que nous croisons avec le type sauvage, nous obtiendrons un triple hétérozygote *sc*/*sc*$^+$, *ec*/*ec*$^+$, *vg*/*vg*$^+$. La recombinaison chez ces hétérozygotes est analysée en réalisant un croisement-test entre des femelles triples hétérozygotes et des mâles triples récessifs (testeurs). Les résultats du croisement-test suivent. La descendance est répertoriée selon les génotypes gamétiques obtenus à partir des femelles hétérozygotes. Huit types gamétiques sont possibles : ils se répartissent comme suit dans la descendance au sein d'un échantillon de 1008 mouches :

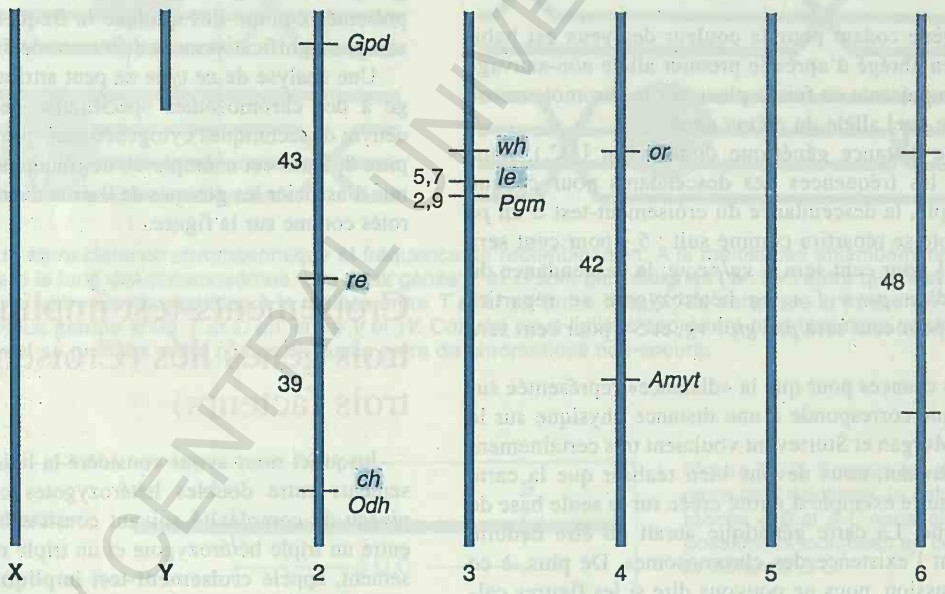
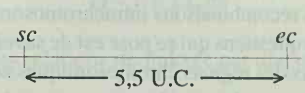


Figure 5-11. (a) Lucilie bouchère : forme adulte sauvage et six mouches dont la couleur des yeux est due à des allèles situés à six loci autosomiques distinctes. (b) Cartes de linkage des 6 loci contrôlant la couleur des yeux et cinq autres loci chez les lucilies bouchères. Les valeurs mentionnées entre les loci représentent les fréquences de recombinaison (D.B. Taylor, USDA).

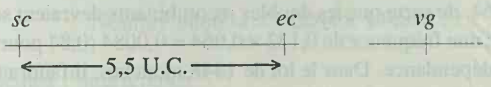
sc	*ec*	*vg*	235
sc$^+$	*ec*$^+$	*vg*$^+$	241
sc	*ec*	*vg*$^+$	243
sc$^+$	*ec*$^+$	*vg*	233
sc	*ec*$^+$	*vg*	12
sc$^+$	*ec*	*vg*$^+$	14
sc	*ec*$^+$	*vg*$^+$	14
sc$^+$	*ec*	*vg*	16
			1008

La manière systématique d'analyser ces croisements consiste à calculer toutes les fréquences de recombinaison possibles, mais il vaut toujours la peine de discuter les données au préalable. Au premier abord, nous pouvons constater l'écart considérable entre les données ci-dessus et le rapport de 1:1:1:1:1:1:1:1 attendu si les gènes n'étaient pas liés. Commençons à calculer les valeurs des fréquences de recombinaison (FR), en prenant les loci deux à deux. En prenant les loci *sc* et *ec* (nous ignorerons le locus *vg* pour l'instant), nous déterminons lesquels des génotypes gamétiques sont recombinants pour *sc* et *ec*. Comme les hétérozygotes sont formés à partir des gamètes *sc ec* et *sc*$^+$*ec*$^+$, nous savons que les produits de la recombinaison à la méiose doivent être *sc ec*$^+$ et *sc*$^+$

ec. Il existe 12 + 14 + 14 + 16 = 56 de ces types; et donc FR = (56/1008) × 100 = 5,5 U.C. Nous savons maintenant que ces loci doivent être étroitement liés sur le même chromosome, comme ci-dessous



Etudions à présent la recombinaison entre les loci *sc* et *vg*. Les génotypes parentaux fourniront les gamètes *sc vg* et sc^+ vg^+ pour l'hétérozygote, de sorte que nous devons calculer la fréquence des types *sc* vg^+ et sc^+ *vg* dans la descendance (cette fois, nous ignorerons le locus *ec*). Nous observons qu'il y a 243 + 233 + 14 + 16 = 506 recombinants; 506/1008 est très proche d'une FR de 50 pour cent, de sorte que les loci *sc* et *vg* ne sont pas liés. Nous pouvons résumer la relation de linkage comme suit :



Il est évident que les loci *ec* et *vg* ne doivent pas être liés non plus. L'analyse de la recombinaison le confirmera. (Essayez de le vérifier).

Un second exemple, utilisant d'autres loci de *Drosophila*, va introduire quelques nouveaux concepts importants. Les allèles non-sauvages seront *v* (vermillon, couleur des yeux), *cv* (absence d'une nervure particulière de l'aile), et *ct* (bord des ailes coupés). Cette fois, un des parents est l'homozygote double récessif v^+v^+ *ctct cvcv*, l'autre l'homozygote récessif simple *vv* ct^+ct^+ cv^+cv^+. Une descendance hétérozygote triple de génotype *vv*$^+$ *ctct*$^+$ *cvcv*$^+$ est issue de ce croisement, et les femelles seront utilisées dans un croisement-test avec un triple récessif de génotype *vv ctct cvcv*. Les gamètes représentant les huit types de la descendance de ce croisement-test sont comptabilisés comme suit dans un échantillon total de 1448 mouches :

v	cv^+	ct^+	580
v^+	*cv*	*ct*	592
v	*cv*	ct^+	45
v^+	cv^+	*ct*	40
v	*cv*	*ct*	89
v^+	cv^+	ct^+	94
v	cv^+	*ct*	3
v^+	*cv*	ct^+	5
			1448

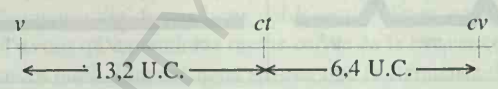
L'approche standard sera à nouveau utilisée, mais nous devons être prudents quant à la classification des types parentaux et recombinants. Notons que les génotypes parentaux fourniront les gamètes v^+ *ct cv* et *v* ct^+ cv^+ pour le triple hétérozygote ; nous devrons en tenir compte au cours de l'identification des recombinants.

En commençant par les loci *v* et *cv*, nous constatons que les recombinants sont de génotype *v cv* et v^+ cv^+ et qu'ils sont 45 + 40 + 89 + 94 = 268 individus sur 1448 mouches, soit une FR de 18,5 pour cent.

Pour les loci *v* et *ct*, les recombinants sont *v ct* et v^+ cv^+. L'addition de ceux-ci, soit 89 + 94 + 3 + 5 = 191, nous permet d'établir une deuxième FR = (191/1448) × 100 = 13,2 pour cent.

Enfin, pour *ct* et *cv*, les recombinants sont *cv* ct^+ et cv^+ *ct*. L'addition de ceux-ci, soit 45 + 40 + 3 + 5 = 93, nous permet de calculer la troisième FR = (93/1448) × 100 = 6,4 pour cent.

Les trois loci sont visiblement liés sur le même chromosome, étant donné que les valeurs de FR sont considérablement inférieures à 50 pour cent. Puisque les loci *v* et *cv* montrent la valeur de FR la plus élevée, ils doivent être les plus éloignés l'un de l'autre; par conséquent, le locus *ct* doit se situer entre eux. Une carte peut être dessinée comme suit :



Il faut souligner à ce stade plusieurs points importants. Premièrement, l'ordre des gènes que nous avons déduit est différent de celui dans lequel les gènes avaient été énumérés chez les individus parentaux ou dans leur descendance. Etant donné que le but de l'exercice était, précisément, d'établir le linkage entre ces gènes, la disposition de départ ne pouvait qu'être arbitraire; l'ordre n'était tout simplement pas connu avant que soient analysées les données.

Deuxièmement, nous avons définitivement établi la position de *ct* entre *v* et *cv*, ainsi que les distances entre *ct* et ces loci en unités cartographiques. Mais nous avons arbitrairement placé *v* à gauche et *cv* à droite : la carte peut en fait très bien être inversée!

Un troisième point à souligner est que la somme des deux plus petites distances établies, soit 13,2 U.C. et 6,4 U.C., est de 19,6 U.C., ce qui est supérieure à 18,5 U.C., la distance calculée pour *v* et *cv*. Comment l'expliquer ? La réponse à cette question se trouve dans la façon dont nous avons analysé les deux classes de recombinants les plus rares qui concernent les loci *v* et *cv*. Maintenant que nous disposons de la carte, nous pouvons constater que ces deux classes rares correspondent en fait à des doubles recombinants issus de deux crossing-over. Un exemple de formation de doubles recombinants à partir de deux crossing-over est illustré à la figure 5-12. Cependant, les génotypes *v ct* cv^+ et v^+ ct^+ *cv* n'ont pas été comptés dans nos calculs de la valeur de FR pour *v* et *cv*; après tout, pour *v* et *cv*, il s'agit de combinaisons parentales (*v* cv^+ et v^+ *cv*). Une fois la carte établie, pourtant, nous voyons que nous avons sous-estimé la distance séparant les loci de *v* et *cv*. Non

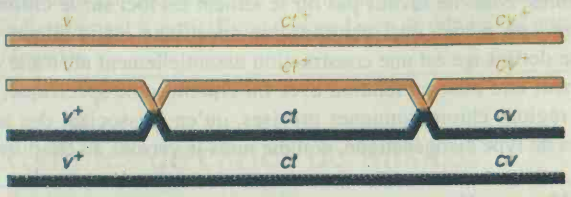


Figure 5-12. Un exemple de double crossing-over. Notez que des chromatides doublement recombinantes sont produites et que les doubles recombinants présentent la combinaison parentale d' allèles pour les loci plus externes.

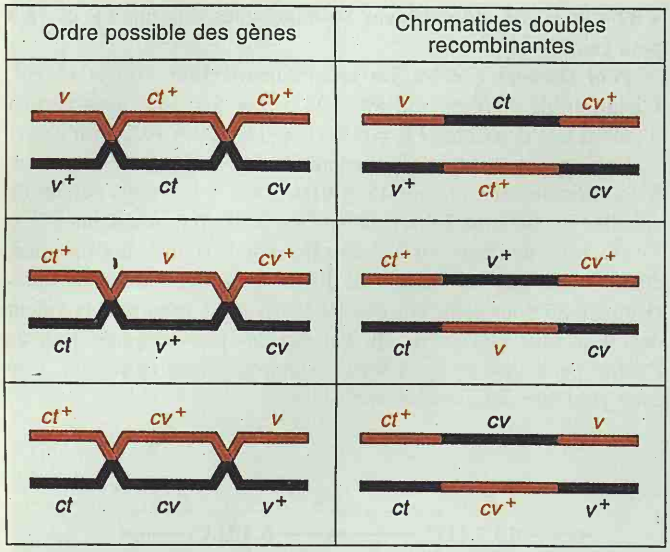


Figure 5-13. Dans le cas de trois gènes, seul trois ordres de gènes sont possibles. Les doubles crossing-over conduisent à des doubles recombinants uniques pour chaque ordre de gènes. La première possibilité est la seule compatible avec les données du texte.

seulement, il fallait inclure ces deux classes rares, mais il aurait fallu les compter deux fois, puisque chacune d'elles représente une classe de doubles recombinants! La correction à apporter s'obtient en ajoutant les nombres : 45 + 40 + 9 + 94 + 3 + 3 + 5 + 5 = 284. La valeur de FR devient (284/1448) x 100 = 19,6 pour cent, ce qui équivaut exactement à la somme des deux valeurs de FR obtenues ci-dessus.

Maintenant, forts de l'expérience acquise avec les données de ce croisement, nous pouvons considérer la composition de la descendance et constater qu'il est souvent possible d'en déduire l'ordre des gènes par simple examen, sans l'aide de l'analyse de la fréquence des recombinants. D'une manière générale, les classes de doubles recombinants sont les moins nombreuses, de sorte que l'ordre des gènes peut en être déduit directement. Etant donné que seuls trois ordres de gènes sont possibles, chacun avec un gène différent en position médiane, un seul ordre devrait être compatible avec les classes de doubles recombinants observées (figure 5-13). Un seul ordre conduit à des doubles recombinants ayant les génotypes *v ct cv*$^+$ et *v*$^+$ *ct*$^+$ *cv*. Notez au passage, que la possibilité à détecter les doubles crossing-over dépend de ce que nous disposions d'une paire de gènes hétérozygotes encadrant chaque crossing-over; si ce croisement n'avait pas été hétérozygote pour *ct*/+, nous n'aurions jamais pu identifier les doubles recombinants.

Enfin, les cartes de linkage ne représentent que les relations d'un locus par rapport aux autres, en utilisant des unités de carte définies. Nous ne savons pas où se situent les loci sur le chromosome - ou même, quel chromosome spécifique est impliqué. La carte de linkage est une construction essentiellement abstraite qui ne peut être mise en relation avec un chromosome spécifique, ou des régions chromosomiques précises, qu'en y associant des analyses de type cytogénétique, comme nous le verrons au chapitre 8.

Message Un croisement-test à trois facteurs (ou plus) permet d'établir à lui seul le linkage entre trois gènes (ou plus).

Interférence

L'obtention des classes de doubles recombinants montre que les doubles crossing-over se produisent réellement. Leur existence soulève un certain nombre de questions, à propos de la nature et de la distribution de ces recombinaisons intrachromosomiques multiples. Une des premières questions qui se pose est de savoir si les crossing-over ayant lieu dans des régions chromosomiques adjacentes se produisent indépendamment les uns des autres, ou si des interactions se produisent entre eux d'une manière ou d'une autre. Par exemple, nous pourrions nous demander si un crossing-over dans une région modifie la probabilité qu'un autre crossing-over ait lieu dans une région adjacente.

L'analyse peut être envisagée de la façon suivante, en utilisant des données semblables à celles obtenues pour la région *v ct cv*. Si les crossing-over dans ces deux régions se produisent indépendamment, et selon la loi des produits (voir page ...), les doubles recombinants devraient présenter la même fréquence que le produit des fréquences de recombinaison dans les régions adjacentes. Dans l'exemple *v – ct – cv*, la FR de *v-ct* est de 0,132, et la FR de *ct – cv* est de 0,064, de sorte que les doubles recombinants devraient se produire avec une fréquence de 0,132 × 0,064 = 0,0084 (0,84 pour cent) s'il y a indépendance. Dans le lot de 1448 mouches, il faudrait s'attendre à 1448 × 0,0084 = 12 doubles recombinants. Pourtant, nous n'en observons que 8. Les deux régions ne sont donc pas indépendantes, et la distribution des crossing-over suggère que les crossing-over simples sont favorisés par rapport aux doubles. Autrement dit, il y a une certaine **interférence** - un phénomène par lequel l'existence d'un crossing-over réduit la probabilité qu'un autre crossing-over se produise dans la région adjacente.

L'interférence peut se quantifier en calculant un terme appelé le **coefficient de coïncidence (c.d.c.)**, qui est le rapport entre le nombre de doubles recombinants observés et celui de doubles recombinants attendus, cette valeur étant ensuite soustraite de 1. A savoir

Interférence (I) = 1 – c.d.c. =

$$= 1 - \frac{\text{Fréquence ou nombre de doubles recombinants observés}}{\text{Fréquence ou nombre de doubles recombinants attendus}}$$

Dans notre exemple

$$I = 1 - \frac{8}{12} = \frac{4}{12} = \frac{1}{3}, \text{ ou } 33\%$$

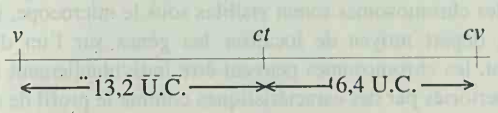
Dans certaines régions, des doubles recombinants n'ont jamais pu être observés. Dans ces cas, c.d.c. = 0, de sorte que I = 1 et l'interférence est maximale. La plupart du temps, les valeurs prises par l'interférence suite à la réalisation d'une carte de loci se situent entre 0 et 1, mais dans certaines situations particulières une interférence négative peut se présenter suite à un excès de doubles recombinants observés par rapport aux doubles attendus.

Les croisements à trois facteurs et leurs prolongements constituent un outil d'analyse de la recombinaison d'une telle valeur qu'il est indispensable d'en faire un résumé étape par étape, en y incluant à la fin le calcul de l'interférence. Nous utiliserons les valeurs numériques obtenues lors du croisement impliquant *v*, *ct*, et *cv*.

1. Calculez les fréquences de recombinaison pour chaque paire de paires de gènes :

$$v - cv = 18{,}5\%$$
$$cv - ct = 6{,}4\%$$
$$ct - v = 13{,}2\%$$

2. Représentez les relations de linkage par une carte de linkage :



3. Déterminez les classes de doubles recombinants.

4. Calculez la fréquence ou le nombre de doubles recombinants attendus s'il n'y a pas d'interférence :

Fréquence attendue = 0,132 × 0,064 = 0,0084

Nombre attendu = 0,0084 × 1448 = 12

5. Calculez l'interférence :

Nombre de doubles recombinants observés = 8

Nombre de doubles recombinants attendus = 12

$$\therefore I = 1 - \frac{8}{12} = \frac{4}{12} = 0{,}33, \text{ ou } 33\%$$

Vous aurez sans doute remarqué que nous utilisons toujours des femelles hétérozygotes pour les croisement-test au cours de cette étude des crossing-over chez la drosophile. Lorsque des mâles *pr vg/ pr*$^{+}$*vg*$^{+}$ sont croisés avec des femelles *prvg/prvg*, seuls les descendants *prvg/pr*$^{+}$*vg*$^{+}$ et *prvg/prvg* sont récupérés. Ce résultat montre que le crossing-over ne se produit pas chez les drosophiles mâles. Toutefois, cette absence de crossing-over chez l'un des sexes est limitée à certaines espèces; ce n'est pas le cas pour les mâles de toutes les espèces (ou pour le sexe hétérogamétique). Chez d'autres organismes, le crossing-over peut survenir chez les mâles XY ou chez les femelles WZ. La raison de cette différence liée au sexe est que la drosophile présente une prophase I inhabituelle, sans complexes synaptonémiques.

Entre parenthèses, une différence dans le taux de recombinaison peut se produire aussi chez l'homme . Pour les mêmes loci, des taux de recombinaison plus élevés chez la femme que chez l'homme ont été observés. Ceci est illustré dans un chapitre ultérieur (Figure 15-37).

Calcul de la fréquence des recombinants à partir de dihybrides autofécondés

Un croisement-test est le moyen le plus approprié de mesurer la fréquence de recombinaison, mais en pratique il n'est pas toujours disponible. Une situation très commune est celle où un nouveau phénotype a été identifié grâce à l'analyse mendélienne comme dû à un génotype donné tel que *aa*. De façon à localiser ce locus nouvellement découvert, l'individu *aa* est croisé avec différents génotypes tel que *bb*, pour lequel le locus du gène *B* est connu. Dans cette situation, on peut se rendre compte que le testeur *aabb* ne sera pas représenté initialement. En fait *aabb* ne peut être obtenu qu'ultérieurement suite à des croisements.

Toutefois, il est possible de calculer les fréquences de recombinaison à partir de l'autofécondation d'un dihybride dû au croisement des deux souches. Dans cet exemple les parents seraient *aaBB* et *Aabb*, et le dihybride *AaBb*. Le dihybride produira des gamètes parentaux, *aB* et *Ab*, et des gamètes recombinants *AB* et *ab*. Au cours de l'autofécondation, les gamètes fusionnent au hasard, et à première vue, il semble que les recombinants ne pourront être identifiés dans la descendance. Cependant, le phénotype aabb vient ici à notre secours parce qu'il est le seul qui doit être dû à la recombinaison, par fertilisation de *ab* par un autre *ab*. Il en résulte que si la fréquence des produits *ab* de la meiose est égal à p, la fréquence des descendants *aabb* sera p^2. Donc pour trouver p nous n'avons qu'à prendre la racine carrée de la fréquence des descendances *aabb*. Puisque nous savons que la fréquence des *ab* est égale à celle des *AB*, il suffit de doubler la valeur de p pour trouver la fréquence totale de recombinants.

Si les deux gènes ne sont pas liés, nous savons que la classe *aabb* sera formé avec une fréquence de $\frac{1}{16}$ (le "1" du rapport 9:3:3:1). Dans ce cas la racine carrée de $\frac{1}{16}$ est $\frac{1}{4}$ et en la doublant nous obtiendrons une RF de $\frac{1}{2}$, ou 50 pourcent, comme attendu. Qu'en est-il dans un cas de liaison ? Cela entraîne une fréquence de *aabb* significativement inférieure à $\frac{1}{16}$. Posons que la fréquence de *aabb* est égale à 0.01 (1 pourcent); la fréquence des produits méiotiques *ab* doit avoir été 0.1 ou 10 pourcent, et la RF est de 20 pourcent, ce qui correspond à un cas très clair de liaison. Notez aussi que si nous désirons calculer les fréquences parentales, elles doivent être de 40 pourcent chacunes (pour *aB* et *Ab*), correspondant à 0.5 (100 – 20) pourcent.

Cette méthode est théoriquement correcte mais en pratique imprécise parce qu' elle se fonde sur une extrapolation à partir d'un seul des phénotypes F_2, et en plus via une racine carrée. Une formulation plus précise a été développée incluant tous les phénotypes F_2. Une valeur comme le *rapport des produits (z)* est calculée et on en dérive la fréquence de recombinaison de la table des valeurs de *z*. Dans le cas du croisement dihybride en répulsion utilisé au-dessus (*Ab/ab*) ce rapport des produits se calcule comme suit, avec les quatre composantes de la formule correspondant aux quatre phénotypes F_2 :

$$z = \frac{(A - B -) \times (aabb)}{(A - bb) \times (aaB -)}$$

Les valeurs RF correspondants aux valeurs selectionnées de *z* sont reprises au tableau 5-2. Des programmes d'ordinateurs calculant les valeurs RF à partir des données F_2 sont aussi disponibles.

Message La fréquence des recombinants peut être calculée indirectement à partir d'une descendance de dihybrides autofécondés.

Exemples de cartes de linkage

Les cartes de linkage sont un aspect essentiel de l'étude génétique de tout organisme. Elles sont le prélude à toute manipulation

Tableau 5-2. Valeurs RF en % correspondant à des valeurs choisies de *z* dans des descendances issues d'autofécondation d'hybrides en répulsion.

z	RF
0,001	2,2
0,005	4,9
0,020	9,9
0,040	13,8
0,100	21,1
0,200	28,5
0,300	33,5
0,500	40,3
0,700	45,0

génétique sérieuse. Les gènes d'un certain nombre d'organismes ont déjà été cartographiés par cette méthode. Les cartes qui en résultent représentent un énorme travail d'analyse génétique appliquée. Les figures 5-14 et 5-15 donnent deux exemples de cartes de linkage, respectivement chez *Drosophila* et la tomate.

De tous les organismes génétiques modèles le génome de *Drosophila* est l'un des plus intensivement cartographié. La carte présenté à la Figure 5-14 ne montre qu'une fraction des loci répertoriés. La tomate aussi s'est avérée très interessante tant en recherche génétique fondamentale qu'appliquée et le génome de la tomate est l'un des mieux cartographiés chez les plantes.

Les illustrations de la Figure 5-15 montrent les stades par lesquels on arrive à établir une carte suffisament complète. D'abord, quoique les chromosomes soient visibles sous le microcope, il n'y a pas au départ moyen de localiser les gènes sur l'un d'eux. Cependant, les chromosomes peuvent être individuellement identifiés, répertoriés par des caractéristiques comme le profil de coloration et la position des centromères, comme c'est le cas dans les parties a et b. Ensuite, l'analyse des fréquences de recombinaison fournit un ensemble de groupes de linkage qui correspond aux chromosomes, mais sans qu'une relation spécifique puisse être établie avec des chromosomes répertoriés. A un certain stade, et comme discuté dans le cas de la lucilie bouchère, l'analyse cytogénétique permet de faire correspondre un groupe de linkage à un chromosome spécifique. La partie c de la figure 5-15 donne la

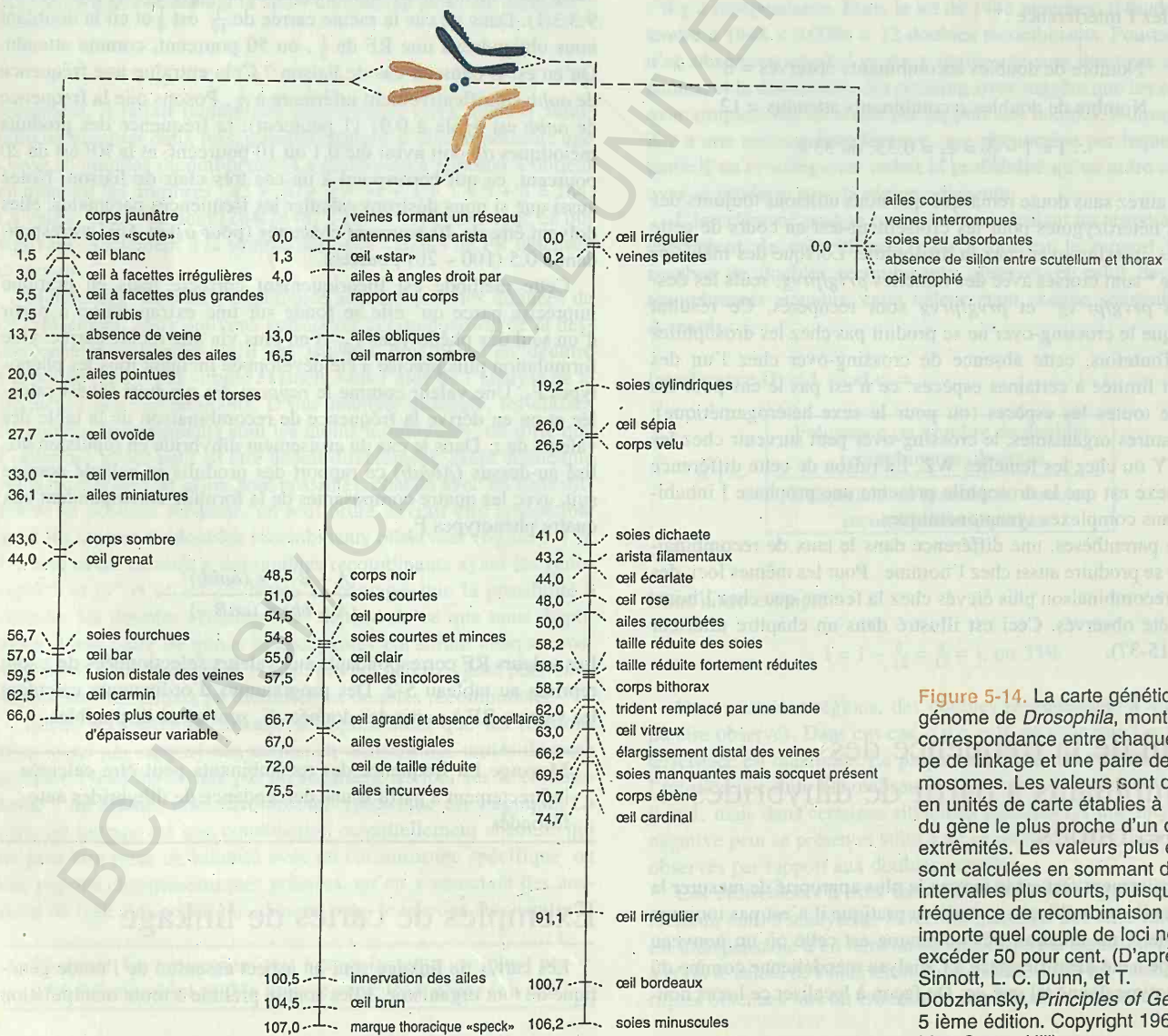


Figure 5-14. La carte génétique du génome de *Drosophila*, montrant la correspondance entre chaque groupe de linkage et une paire de chromosomes. Les valeurs sont données en unités de carte établies à partir du gène le plus proche d'un des extrêmités. Les valeurs plus élevées sont calculées en sommant des intervalles plus courts, puisque la fréquence de recombinaison pour n' importe quel couple de loci ne peut excéder 50 pour cent. (D'après E.W. Sinnott, L. C. Dunn, et T. Dobzhansky, *Principles of Genetics*, 5 ième édition. Copyright 1962 chez Mac Graw - Hill).

BCU Lausanne

carte de la tomate, et le linkage entre gènes comme établi en 1952. Chaque locus est representé par les deux allèles utilisés dans les expériences de localisation chromosomique. Au fur et à mesure que plus de loci furent identifiées, ils furent localisés par rapport à ceux repris sur la figure, de telle sorte que la carte aujourd'hui en inclut des centaines. Certains des numéros attribués aux chromosomes montrés dans la partie c sont spéculatifs et ne correspondent pas au système de numérotation moderne des chromosomes.

Le test du χ^2

En science, il est souvent nécessaire de comparer des valeurs expérimentales réparties en plusieurs catégories avec celles prédites sur la base d'une hypothèse. En cas d'étroite concordance, l'hypothèse est considérée comme maintenue; par contre, si la concordance est faible, l'hypothèse est rejetée. Pour en juger, nous devons disposer d'un test pour décider si les valeurs observées concordent suffisamment avec celles qui sont attendues. Il n'y a généralement pas de problèmes si les valeurs sont très proches ou au contraire très discordantes, mais inévitablement il y a des zones d'incertitude pour lesquelles la décision n'est pas évidente. L'analyse génétique débouche souvent sur l'interprétation de la répartition de nombres d'individus dans différentes classes phénotypiques. Dans de tels cas, on fait appel à un test statistique appelé le test du χ^2 pour décider soit d'accepter soit de rejeter une hypothèse donnée. Par exemple, le test peut être utilisé pour analyser des rapports mendéliens et fournir une réponse à des questions comme : ces résultats expérimentaux sont-ils compatibles avec le rapport 12:3:1 théoriquement attendu dans le cas d'épistasie dominante ? Une autre application très répandue concerne l'existence d'une liaison entre gènes. Le critère génétique de liaison est l'absence d'assortiment indépendant. Nous ne pouvons tester directement l'existence d'une liaison puisque nous ne disposons pas d'une distance de linkage précise à utiliser dans le test, de sorte que nous sommes obligés de tester l'hypothèse d'une absence de liaison. Si les résultats observés entraînent le rejet de l'hypothèse *absence de linkage,* nous en déduisons qu'une liaison existe. Ce type d'*hypothèse nulle* est généralement utile dans l'analyse χ^2 en fournissant une prédiction expérimentale donnée qui peut être testée.

Le test χ^2 est une façon de quantifier les écarts qui se produisent par chance si l'hypothèse est vraie. Prenons le cas d'une hypothèse simple, par exemple l'existence d'un rapport 1:1. Même si l'hypothèse est vraie, nous ne nous attendons pas à trouver toujours exactement un rapport 1:1. Nous pouvons nous représenter ce test sous la forme d'une urne contenant un nombre égal de billes rouges et bleues. Si, en aveugle, nous prélevons des échantillons de 100 billes, nous nous attendons à trouver fréquemment des écarts plus importants comme 60 rouges pour 40 bleues. Le test de χ^2 nous permet de calculer la probabilité que de telles écarts soient dus à la chance. Mais, si toutes les valeurs prises par les écarts sont assorties de probabilités différentes même si l'hypothèse est vraie, sur quelle base pourrions-nous rejeter une hypothèse ? C'est une convention scientifique généralement admise qu'une probabilité moindre ou égale à 5% doit être prise comme critère de rejet de l'hypothèse nulle. L'hypothèse peut être encore vraie, mais nous devons prendre une décision et le niveau de 5% est une valeur conventionelle. La logique de ce raisonnement tient à ce que, même si des résultats s'écartant à ce point des valeurs attendues se présentent 5% du temps quand l'hypothèse nulle est vraie, nous ne rejeterons par erreur l'hypothèse que dans 5% des cas et nous assumons cette chance d'erreur.

Considérons un ensemble de données concernant un cas de liaison sur la base d'une analyse χ^2 Disons que nous avons croisé deux lignées pures de génotypes AABB et aabb et obtenu un dihybride AaBb qui a été utilisé dans un croisement-test avec aabb. En tout, 500 descendants ont été classés comme suit et désignés en tant que gamètes issus du dihybride.

140	AB
135	ab
110	Ab
115	aB

A partir de ces données, la fréquence de recombinaison est de 225/500 = 45%. Ceci peut apparaître comme un cas de liaison puisque la fréquence de recombinaison est inférieure à celle attendue sur la base d'un assortiment indépendant (50%). Cependant, nous ne pouvons exclure que les deux classes de recombinants ne soient minoritaires que sur la seule base du hasard, et c'est pourquoi nous devons réaliser un test χ^2. Le χ^2 se calcule toujours à partir des nombres réels, non à partir de pourcentages ou de fractions. La taille de l'échantillon est dès lors très importante, comme ce l'est dans tous les cas dans les phénomènes dus au hasard. Les échantillons à tester comportent généralement plusieurs classes. La lettre O représente le nombre observé dans une classe, et E le nombre attendu pour la même classe sur la base de l'hypothèse. La formule générale du χ^2 est la suivante :

$$\chi^2 = \text{total de } \frac{(O - E)^2}{E} \text{ pour toutes les classes}$$

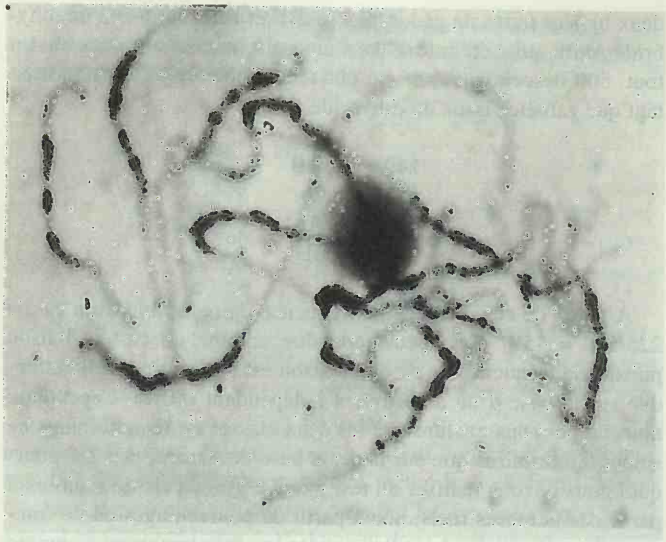
Il nous faut donc déterminer les valeurs prédites par l'hypothèse, E pour chacune des classes. Dans le cas du test de liaison, les classes phénotypiques sont disposées dans un **tableau de contingence** (Tableau 5-3). Le tableau représente les combinaisons au hasard des rapports alléliques de deux loci.

Tableau 5-3. Tableau de contingence comparant les résultats observés et attendus d'un croisement-test destiné à établir s'il y a une liaison entre les loci A/A et B/b.

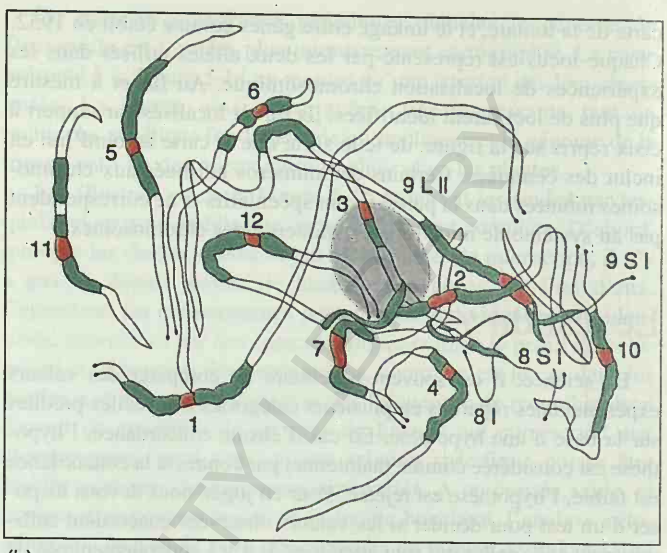
Locus 2	B		b		
	O	E	O	E	Total
Locus 1					
A	140	$\frac{255 \times 250}{500} = 127{,}5$	110	$\frac{245 \times 250}{500} = 122{,}5$	250
a	115	$\frac{255 \times 250}{500} = 127{,}5$	135	$\frac{245 \times 250}{500} = 122{,}5$	250
Total	255		245		500

Le χ^2 permet de tester si oui ou non les nombres d'individus présents dans les quatre classes phénotypiques de la descendance sont simplement dus aux rapport alléliques se combinant au hasard, comme on s'y attend dans le cas de l'hypothèse de l'assortiment indépendant. Les valeurs attendues se calculent en divisant les totaux par colonne par ceux des rangées. La valeur du χ^2 se calcule comme suit :

Classe	O	E	$\frac{(O - E)^2}{E}$
AB	140	127,5	1,23
ab	135	122,5	1,28
Ab	110	122,5	1,28
aB	115	127,5	1,23
			Total : $\chi^2 = 5{,}02$



(a)



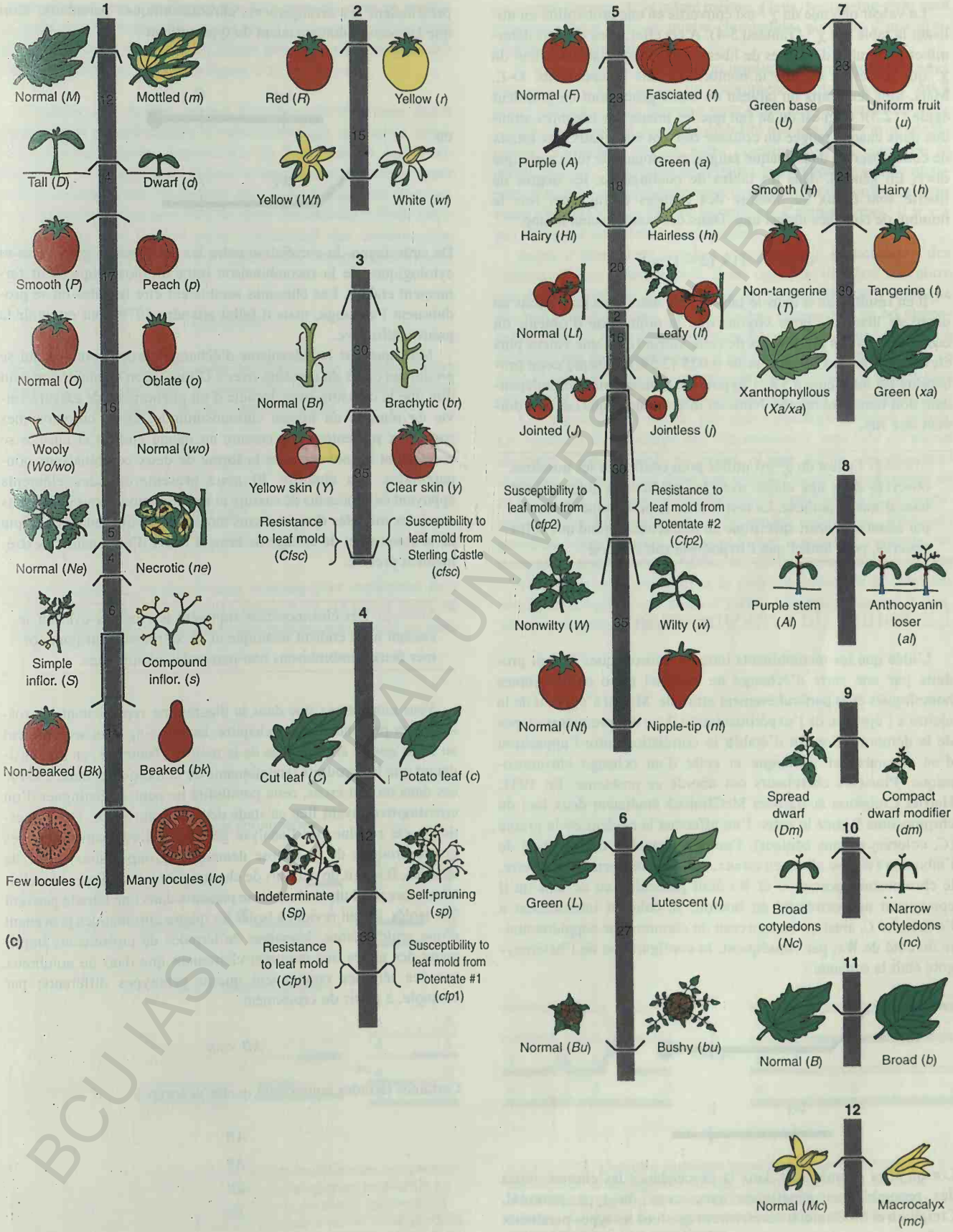
(b)

Figure 5-15. Cartographie des chromosomes de la tomate. (a) Microphotographie d'un stade pachytène (prophase I) dans des anthères montrant les 12 paires de chromosomes. (b) .Le système de numérotation couramment utilisé pour les chromosomes. Les centromères sont colorés et les régions adjacentes densément colorées (hétérochromatine) sont notées en noir. c) Une carte de linkage établie en 1952 montrant les groupes de linkage connus à cette époque. A chaque locus sont associées des dessins du phénotype variant qui a permis d'identifier le locus génétique et le phénotype normal qui y est associé. Les distances entre locus sont données en unités de cartes. (Parties a et b d'après C. M. Rick., «The Tomato», *Scientific American*, 1978, .partie c d'après L.A. Butler).

Tableau 5-4. Valeurs critiques de la distribution χ^2

dl \ p	0,995	0,975	0,9	0,5	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	dl
1	,000	,000	0,016	0,455	2,706	3,841	5,024	6,635	7,879	1
2	0,010	0,051	0,211	1,386	4,605	5,991	7,378	9,210	10,597	2
3	0,072	0,216	0,584	2,366	6,251	7,815	9,348	11,345	12,838	3
4	0,207	0,484	1,064	3,357	7,779	9,488	11,143	13,277	14,860	4
5	0,412	0,831	1,610	4,351	9,236	11,070	12,832	15,086	16,750	5
6	0,676	1,237	2,204	5,348	10,645	12,592	14,449	16,812	18,548	6
7	0,989	1,690	2,833	6,346	12,017	14,067	16,013	18,475	20,278	7
8	1,344	2,180	3,490	7,344	13,362	15,507	17,535	20,090	21,955	8
9	1,735	2,700	4,168	8,343	14,684	16,919	19,023	21,666	23,589	9
10	2,156	3,247	4,865	9,342	15,987	18,307	20,483	23,209	25,188	10
11	2,603	3,816	5,578	10,341	17,275	19,675	21,920	24,725	26,757	11
12	3,074	4,404	6,304	11,340	18,549	21,026	23,337	26,217	28,300	12
13	3,565	5,009	7,042	12,340	19,812	22,362	24,736	27,688	29,819	13
14	4,075	5,629	7,790	13,339	21,064	23,685	26,119	29,141	31,319	14
15	4,601	6,262	8,547	14,339	22,307	24,996	27,488	30,578	32,801	15

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La valeur obtenue du χ^2 est convertie en une probabilité en utilisant la table des χ^2 (Tableau 5-4). A cet effet, nous devons déterminer le nombre de degrés de liberté (dl) utilisés dans le calcul du χ^2 qui se définit comme le nombre d'écarts indépendents, O-E. Mais, tous les écarts du tableau de contingence sont de grandeur égale (12.5)! Ceci est dû au fait que les totaux des nombres attendus dans chaque rangée ou colonne doivent être égaux aux totaux de ceux observés dans chaque rangée et colonne, de telle sorte que dl=1. En général, dans les tables de contingence, les degrés de liberté sont égaux au nombre des rangées moins une, fois le nombre de colonnes moins une. Dans cet exemple,cela donne :

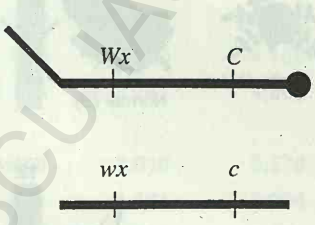
$$dl = (2 - 1) \times (2 - 1) = 1$$

Il en résulte que si dans le tableau 5-4 nous nous rapportons au degré de liberté 1, nous voyons que la probabilité d'obtenir un écart vis à vis des prédictions de cette valeur (ou d'une valeur plus élevée) par le seul hasard est de 0.025 (2.5%). Puisque cette probabilité est inférieure à 5%, l'hypothèse d'un assortiment indépendant doit donc être rejetée. Nous en inférons donc que ces loci doivent être liés.

Message Le test du χ^2 est utilisé pour confronter les nombres observés dans une classe avec les prédictions obtenues sur base d'une hypothèse. Le test fournit la probabilité d'obtenir par chance un écart spécifique au moins aussi grand que celui observé, pour autant que l'hypothèse soit correcte.

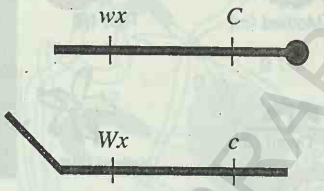
La nature du crossing-over

L'idée que les recombinants intrachromosomiques étaient produits par une sorte d'échange de matériel entre chromosomes homologues était particulièrement attirante. Mais il s'agissait de la mettre à l'épreuve de l'expérimentation. Une des premières étapes de la démonstration fut d'établir la corrélation entre l'apparition d'un recombinant génétique et celle d'un échange chromosomique. Plusieurs chercheurs ont abordé ce problème. En 1931, Harriet Creighton et Barbara McClintock étudiaient deux loci du chromosome 9 chez le maïs: l'un affectant la couleur de la graine (*C*, colorée; *c*, sans couleur), l'autre affectant la composition de l'albumen (*Wx*, ou albumen cireux, *wx*, amidon normal). En outre, le chromosome portant *C* et *Wx* était particulier en ce sens qu'il comportait une extrémité en bouton, se colorant intensément à l'extrémité *C*, ainsi qu'un morceau de chromosome supplémentaire du côté de *Wx*; par conséquent, la configuration de l'hétérozygote était la suivante :



Lorsqu'elles comparèrent dans la descendance les chromosomes des recombinants génétiques avec ceux du type parental, Creighton et McClintock découvrirent que tous les types parentaux présentaient les arrangements chromosomiques parentaux, alors que les recombinants étaient du type suivant :

ou



De cette façon, la corrélation entre les événements génétiques et cytologiques de la recombinaison intrachromosomique était fermement établie. Les chiasmas semblaient être les sites où se produisaient l'échange, mais il fallut attendre 1978 pour en avoir la preuve définitive.

Mais quel est le mécanisme d'échange chromosomique qui se produit au cours du crossing-over ? D'une façon sommaire on peut dire que le crossing-over découle d'un phénomène de cassure suivie de réunion au niveau chromosomique. Deux chromosomes parentaux présentent une cassure au même endroit et ensuite se réassocient à nouveau sous la forme de deux combinaisons non-parentales. Au chapitre 20 nous présenterons des éléments appuyant ce processus de cassure et réassociation. Nous étudierons aussi des modèles des processus moléculaires qui rendent compte de la coupure et de collage de brins d'ADN d'une manière extrêmement précise.

Message Les chromosomes subissent le crossing-over en se cassant à un endroit identique et en se réassociant pour former deux combinaisons non-parentales réciproques.

Vous constaterez que dans la diagramme représentant le crossing-over présenté dans ce chapitre, les crossing-over se déroulent au stade quatre chromatides de la méiose. Toutefois, en ne considérant que les produits recombinants de la méiose, comme c'est le cas dans un test-cross, cette possibilité ne peut se distinguer d'un crossing-over ayant lieu au stade deux chromosomes. Cette question a été résolue par l'analyse génétique d'oganismes dont les quatre produits de la méiose demeurent groupés sous forme de tétrades. Il s'agit de certains de champignons et d'algues unicellulaires. Les produits de la méiose présents dans une tétrade peuvent être isolés, ce qui revient à isoler les quatre chromatides provenant d'une seule méiose. L'analyse de tétrades de croisements impliquant des gènes liés montrent clairement que dans de nombreux cas ces tétrades contiennent quatre génotypes différents; par exemple, à partir du croisement

$$AB \times ab$$

Certaines tétrades comportent quatre génotypes

AB
Ab
aB
ab

Ce résultat ne peut s'expliquer que si le crossing-over se produit au stade quatre chomatides, parce que s'il se produisait au stade deux chromatides il ne pourrait exister plus de deux génotypes différents par méiose, comme la figure 3-16 le démontre.

L'analyse des tétrades permet d'explorer de nombreux autres aspects de la recombinaison intrachromsomique qui seront considérés en détail dans les chapitres 6 et 20. Pour l'instant, nous l'utiliserons pour donner une réponse à deux autres questions ayant trait au crossing-over. En premier lieu, se peut-il que des crossing-over mutliples concernent plus de deux chromatides ? Cette question ne peut être résolue qu'en considérant des crossing-over doubles et nécessairement trois gènes liés. Par exemple dans le croisement suivant

$$ABC \times abc.$$

Plusieurs types de tétrades sont possibles, mais certains d'entre eux ne peuvent être que le résultat de doubles crsossing-over. Considérons la tétrade suivante comme example :

ABC
AbC
aBC
abc

Cette composition résulte de deux crossing-over impliquant trois chromatides, comme décrit à la figure 5-17. D'autres types de tétrades indiquent que les quatre chromatides participent au crossing-over au cours de la même méiose. Donc, le crossing-over peut concerner deux, trois ou quatre chromatides au cours d'une division méiotique unique.

Si toutes les chromatides sont impliquées, nous pouvons nous demander s'il n'existe pas un phénomène d'interférence, c'est à dire l'existence d'un crossing-over entre deux chromatides non-soeurs n'affecte-t-il pas la probabilité que ces deux chromatides soient concernées par un autre crossing-over au cours de la même méiose ? L'analyse de tétrades peut répondre à cette question et montre que généralement la répartition des crossing-over entre chromatides se fait au hasard; en d'autres termes, il n'y a pas d'interférence entre chromatides.

Avant d'abandoner le sujet concernant la participation des chromatides au crossing-over, il est opportun de poser une autre question concernant la possibilité qu'un crossing-over implique des chromatides soeurs. Chez certaines organismes un tel phénomène a été en effet démontré mais puisqu'il ne donne pas lieu à la formation de recombinants, il est d'usage de ne représenter ce type d'échange dans les schémas de crossing-over d'autant plus qu'il n'est pas clair qu'il se produise chez tous les organismes.

Le crossing-over est un processus remarquablement précis. Le synapsis et l'échange des chromosomes sont tels qu'aucun segment n'est ni perdu ni gagné et que quatre chromosomes complets se retrouvent dans une tétrade. Notre connaissance de la nature des évènements moléculaires ayant trait à la recombinaison intrachromosomique a fortement progressée. Plusieurs processus moléculaires semblent y être associés, y compris des coupures monobrins d'ADN, le déroulement, la formation d'ADN hybride, l'excision et la polymérisation de nucléotides ainsique la ligation de brins d'ADN. Ces points seront à nouveau envisagés au chapitre 20.

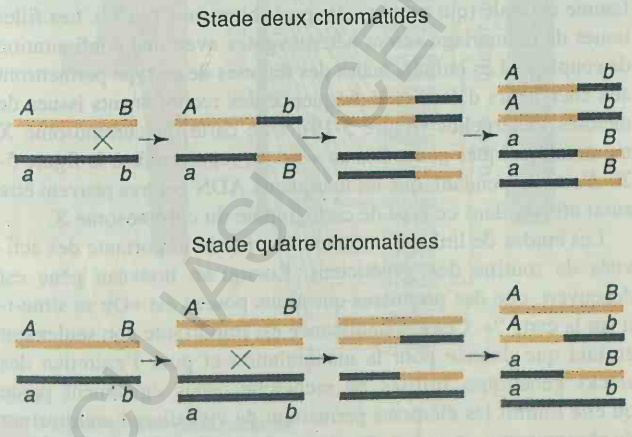


Figure 5-16. L'analyse de tétrade fournit les données qui permettent aux généticiens de décider si le crossing-over se produit au stade deux brins (deux chromosomes) ou au stade quatre brins (quatre chromatides) de la méiose. Puisque plus de deux produits différents sont issus d'une seule méiose chez certaines tétrades, le crossing-over ne peut pas se produire au stade deux brins.

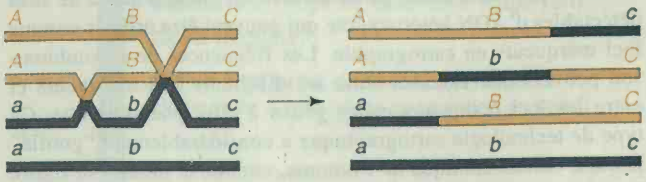


Figure 5-17. L'un des plusieurs types possibles de tétrades issues d'un crossing-over double, montrant que plus de deux chromatides doivent être impliquées dans l'échange des segments. . Ce genre de données rend le modèle de Belling (de copie sélective) très improbable

Etablissement chez l'homme d'une carte factorielle basée sur la recombinaison

Des milliers de cas d'hérédité autosomique ont été identifiés chez l'homme et il semblerait donc relativement aisé de cartographier les loci des gènes correspondant à ces phénotypes grâce aux techniques mentionnées dans ce chapitre. Cependant, initialement les progrès dans l'établissement d'une carte chromosomique ont été relativement lents et ceci pour plusieurs saisons. Tout d'abord, la réalisation de croisements contrôlés n'est pas possible, et les généticiens n'eurent comme recours que de calculer les fréquences de recombinaison à partir de rares dihybrides issus par chance d'unions humaines. Il en résulte que l'équivalent de croisements-test était extrêmement peu représenté. En outre, les descendances chez l'homme ne comportent qu'un petit nombre d'individus ce qui rend difficile d'obtenir assez de données pour établir des distances entre gènes suffisamment fiables. Troisièmement, la taille du génome humain est immense ce qui rend importantes en moyenne les distances existant entre gènes.

Récemment plusieurs progrès technologiques ont permis un développement rapide de la cartographie du génome humain. Une première étape, faisant usage de la technique de fusion de cellules entre humain et rongeur (voir chapitre 17) a permis d'assigner de nombreux gènes humains à des chromosomes spécifiques. Cette technique a aussi permis un début de cartographie le long d'un chromosome spécifique. Mais les progrès les plus sensibles sont peut-être dus à l'utilisation d'ADN marqueurs qui jouent le rôle de points de référence ou "bornes" le long du chromosome. Il a été établi que les génomes de tous les organismes présentent de nombreuses sites de variation neutre au niveau de l'ADN. Autrement dit, quoique tous les individus d'une même espèce possèdent plus ou moins les mêmes gènes localisés aux mêmes endroits, ces individus diffèrent par les sites de variation neutre qu'ils présentent. Ces sites sont désignés comme neutres en ce sens qu'ils n'ont pas d'effet connu sur le phénotype. Parfois un site neutre ne présente qu'une différence d'un seul nucleotide au sein d'un gène ou entre gènes; parfois le site contient un nombre variable de duplications en tandem "d'ADN poubelle" présent entre les gènes. Bien que ces variants n'aient pas d'effet phénotypique, ils sont exploitables par le généticien parce que si un individu est hétérozygote pour un de ces sites, les deux types différents d'ADN présents à ce site peuvent être considérés comme des allèles et utilisés en cartographie comme des allèles hétérozygotes à effet phénotypique reconnu. De fait, les individus contiennent généralement un grand nombre de sites détéctables d'ADN hétérozygote qui peuvent être utilisés comme loci marqueurs en cartographie. Les fréquences de recombinaison peuvent être calculés entre les différents loci marqueurs et entre les loci marqueurs et les gènes à effet phénotypique. Ce type de technologie cartographique a considérablement "gonflé" la carte chromosomique de l'homme, comme le montre la figure 5-18. La méthodologie associée à la localisation des marqueurs ADN est répertoriée aux chapitres 15 et 17.

Le chromosome X s'est toujours mieux prêté à la cartographie par analyse de la recombinaison que les autosomes, et le premier chromosome humain à être cartographié fut le chromosome X. La raison de ce succès réside dans le fait que les mâles sont hémizygotes pour les gènes liés au chromosome X et, exactement comme nous l'avons fait pour *Drosophila*, si nous ne considérons que la descendance mâle d'une femelle dihybride nous disposons d'un échantillon représentant sa contribution gamétique. Autrement dit, nous avons une approximation proche d'un cas de croisement -test. Considérons la situation suivante où interviennent les gènes récessifs rares d'un métabolisme défectueux du sucre (*g*), et du daltonisme (*c*). Un homme portant ces deux gènes (*cg*/Y) se marie avec une femme normale (qui est plus que probablement *CG*/*CG*). Les filles issues de ce mariage seront hétérozygotes avec une configuration de couplage. Les enfants mâles des femmes de ce type permettront aux chercheurs d'étudier la fréquence des recombinants issues de méioses maternelles (figure 5-19). Une carte du chromosome X montrant quelques gènes liés au sexe est représentée à la figure 5-20. Notez, cependant, que les marqueurs ADN neutres peuvent être aussi utilisés dans ce type de cartographie du chromosome X.

Les études de linkage occupent une partie importante des activités de routine des généticiens. Lorsqu'un nouveau gène est découvert, une des premières questions posées est «Ou se situe-t-il sur la carte ?». Cette connaissance est importante non seulement en tant que donnée pour la manipulation et pour l'entretien des stocks génétiques utilisés en recherche, mais également parce qu'elle fournit les éléments permettant de visualiser l'architecture du chromosome, et en fait, du génome entier. La méthode de détection du linkage est la même, du virus à l'homme, et correspond à mettre en évidence la non-indépendance des gènes dans leur transmission de génération en génération. Gardez ceci à l'esprit quand nous discuterons linkage dans le chapitre suivant.

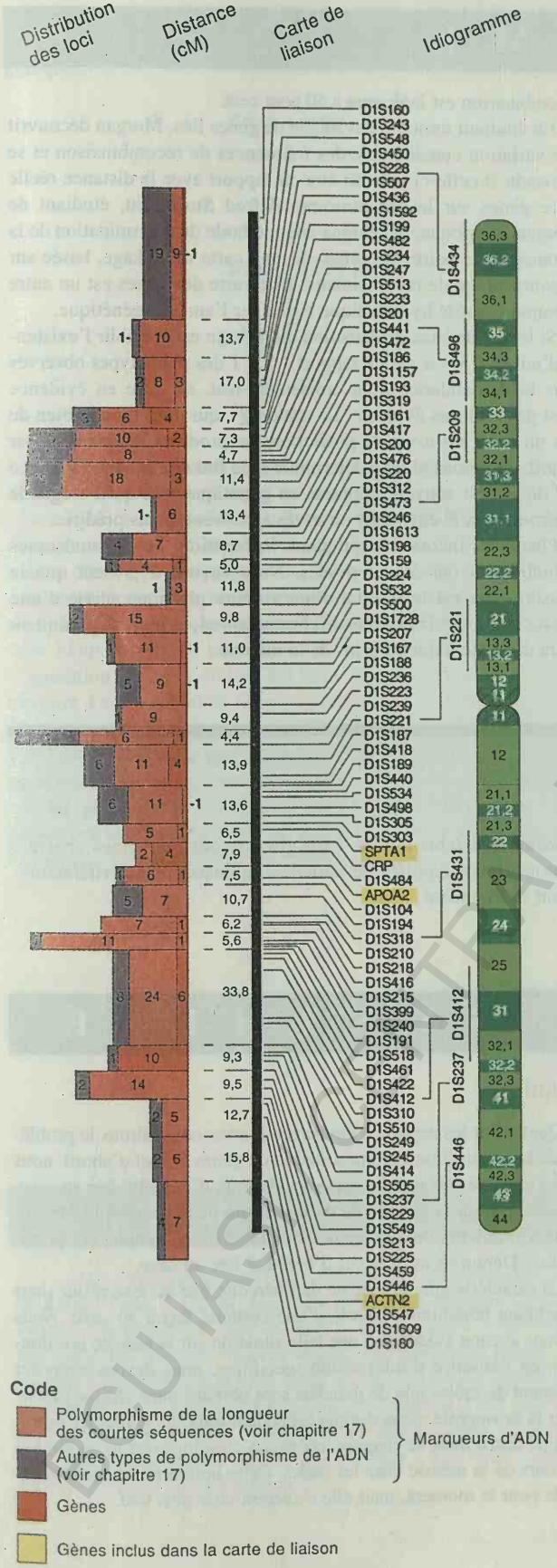
Figure 5-18. (page opposée). Carte de liaison du chromosome 1 chez l'homme, en corrélation avec l'arrangement des bandes chromosomiques. L'histogramme montre la distribution de tous les marqueurs disponibles pour le chromosome 1. Certains des marqueurs sont des gènes de phénotype identifié, mais la majorité d'entre eux sont des marqueurs ADN dus à des variations neutres de séquence.

Une carte de liaison, établie sur la base de l'analyse des fréquences de recombinaison du type envisagé dans ce chapitre est figurée au centre. Elle ne montre qu'une partie des marqueurs disponibles. Les distances sont mentionnées en cM (=u.c.). La longueur totale de la carte du chromosome 1 est de 356 cM; c'est le plus long des chromosomes humains.

La position de certains marqueurs est aussi intégrée dans un diagramme de sous-régions du chromosome 1 établie sur la base d'un arrangement standard des bandes. Un tel diagramme est nommé idiogramme. Ces types de correlation ne peuvent se faire qu'à partir d'un analyse cytogénétique (chapitre 8) et par hybridisation *in situ* (chapitre 17). La plupart des marqueurs indiqués sur la carte sont de nature moléculaire, mais plusieurs gènes (marqués de jaune) sont aussi inclus.

APOA2	apolipoprotéine
ACTN2	actine
CRP	protéine C-réactive
SPTA1	spectrine

(B.R. Jasney et al., Science, Sept. 30, 1994)



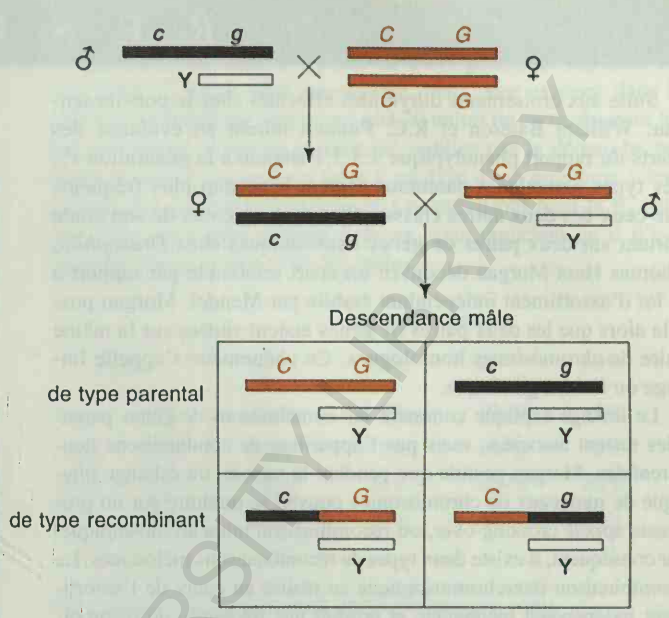


Figure 5-19. Les proportions phénotypiques chez les enfants mâles de femmes hétérozygotes pour deux gènes liés au chromosome X peuvent être utilisés pour calculer la fréquence de recombinaison.
Il en résulte que la carte du chromosome X peut s'établir en se basant sur des arbres généalogiques de ce type.

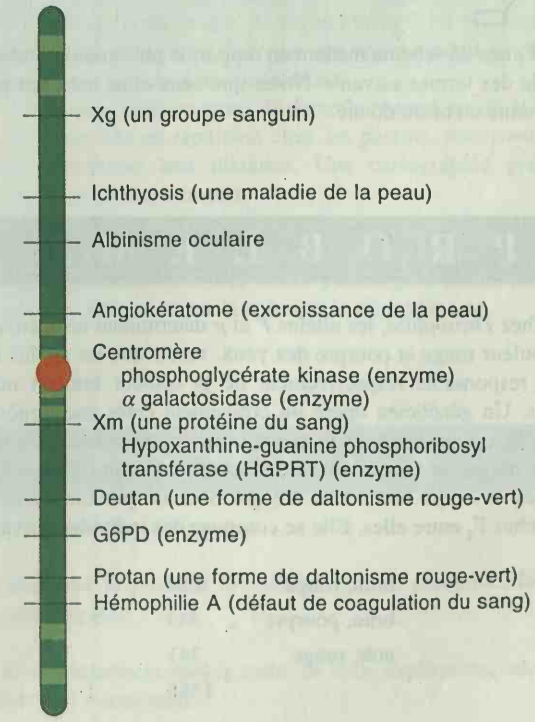


Figure 5-20. Carte de linkage du chromosome X chez l'homme. Il s'agit ici de l'une des toutes premières cartes de chromosomes humains. Elle n'est basée que sur l'analyse RF des loci désignés et ne se fonde donc pas sur l'emploi de marqueurs moléculaires ou de techniques d'hybridisation de cellules somatiques (Chapitre 17). La localisation des loci sur la carte n'est qu'expérimentale. (Issu de W.F. Bodmer et L.L. Cavalli-Sforza, *Genetics, Evolution and Man.* Copyright 1976 par W.H. Freeman and Company).

PCU IAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

RÉSUMÉ

Suite aux croisements dihybrides effectués chez le pois de senteur, William Bateson et R.C. Punnett mirent en évidence des écarts du rapport phénotypique 9:3:3:1 attendu à la génération F_2. Les types gamétiques parentaux étaient beaucoup plus fréquents que ceux des deux autres classes. Plus tard, au cours de son étude portant sur deux paires de gènes autosomiques chez *Drosophila*, Thomas Hunt Morgan découvrit un écart semblable par rapport à la loi d'assortiment indépendant établie par Mendel. Morgan postula alors que les deux paires de gènes étaient situées sur la même paire de chromosomes homologues. Ce phénomène s'appelle linkage ou liaison génétique.

Le linkage explique comment les combinaisons de gènes parentales restent associées, mais pas l'apparition de combinaisons non-parentales. Morgan postula que pendant la méiose, un échange physique de morceaux de chromosomes pouvait se produire par un processus appelé crossing-over, ou recombinaison intrachromosomique. Par conséquent, il existe deux types de recombinaisons méiotiques. La recombinaison interchromosomique se réalise au cours de l'assortiment indépendant mendélien, et produit une fréquence de recombinaison de 50 pour cent. La recombinaison intrachromosomique se produit lorsqu'un linkage physique des combinaisons de gènes parentaux empêche l'assortiment indépendant, de sorte que la fréquence de recombinaison est inférieure à 50 pour cent.

En étudiant toujours davantage de gènes liés, Morgan découvrit une variation considérable des fréquences de recombinaison et se demanda si celle-ci pouvait être en rapport avec la distance réelle entre gènes sur le chromosome. Alfred Sturtevant, étudiant de Morgan à l'époque, développa une méthode de détermination de la distance entre paires de gènes sur une carte de linkage, basée sur le pourcentage de recombinants. Une carte des gènes est un autre exemple d'entité hypothétique basée sur l'analyse génétique.

Si le test de base de détection du linkage est d'établir l'existence d'un écart vis-à-vis du rapport 1:1:1:1 des phénotypes observés dans la descendance d'un croisement-test, sa mise en évidence n'est pas toujours évidente. Le test du χ^2, qui nous dit combien de fois un écart vis-à-vis de prédictions se produira uniquement par hasard, peut nous aider à déterminer si le linkage existe ou pas. Le test du X^2 est souvent appliqué en génétique, dès qu'il s'agit de confronter les évènements observés aux évènements prédits.

Plusieurs théories expliquant l'obtention de chromosomes recombinants ont été proposées. Nous savons à présent que le crossing-over est le résultat d'une rupture physique suivie d'une réassociation des fragments de chromosomes, et qu'il se produit au cours du stade à quatre brins de la méiose.

Diagramme conceptuel

Faites un schéma mettant en rapport le plus grand nombre possible des termes suivants. Notez que ceux-ci ne sont pas présentés dans un ordre donné.

crossing-over/chromatide/cartographie:chromosomes:croisement-test/linkage/unités de carte/recombinaison/additivité/assortiment indépendant.

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Chez *Drosophila*, les allèles *P* et *p* déterminent respectivement la couleur rouge et pourpre des yeux, tandis que les allèles *B* et *b* sont responsable respectivement de la couleur brun et noir du corps. Un généticien opère un croisement entre une lignée pure femelle à yeux pourpres et corps brun et une lignée pure mâle à yeux rouges et corps noir. Les mouches F_1 sont toutes à yeux rouges et corps brun. Une F2 est obtenue par croisement des mouches F_1 entre elles. Elle se compose des individus suivants :

brun, rouge	684
brun, pourpre	343
noir, rouge	341
	1368

Que nous disent ces données sur la localisation chromosomique des gènes impliqués ?

Solution

Quels sont les aspects à envisager si nous considérons le problème de la localisation chromosomique de gènes ? Tout d'abord, nous avons à séparer les cas d'autosomes de ceux d'hérédité liée au sexe. Ensuite se pose la possibilité de liaison ou de ségrégation indépendante. Comment pouvons-nous faire une distinction entre ces possibilités ? Débutons avec le cas d'hérédité liée au sexe.

La caractéristique principale de l'hérédité liée au sexe réside dans un schéma héréditaire associé d'une certaine façon au sexe. Nous n'avons aucune évidence d'une telle situation sur la base de nos données; en l'absence d'information spécifique, nous devons supposer qu'autant de mâles que de femelles sont obtenus dans chaque classe. Chez la drosophile, nous devons cependant toujours garder à l'esprit, comme décrit dans ce chapitre, qu'aucun crossing-over ne se produit au cours de la méiose chez les mâles. Cette notion ne sera plus envisagée pour le moment, mais elle s'avérera utile plus tard.

Ayant établi que les deux gènes en cause sont autosomiques, nous pouvons bâtir les croisements en utilisant des symboles géniques.

P $BBpp \times bbPP$

↓

F_1 $Bp\ Pp$

$BbPp \times BbPp$

↓

F_2 $B-P-$

$B-pp$

$bbP-$

Ceci nous permet de mieux voir ce qui est si inhabituel dans ces données. Le croisement entre les mouches, est un croisement de type dihybride et selon la deuxième loi de Mendel nous nous attendons dans le cas de ségrégation indépendante à l'existence de quatre classes phénotypiques F_2, dans un rapport 9:3:3:1. Trois classes phénotypiques seulement ont pu être identifiés et leur rapport est de 2:1:1. La classe manquante est représentée par le génotype *bbpp*. Donc, un phénomène doit se produire qui empêche l'apparition de cette classe. En nous rappelant la discussion au chapitre 4 sur la léthalité, nous pourrions spéculer que le génotype *bbpp* est léthal. Ceci est peu vraisemblable, puisqu'un rapport 9:3:3 en résulterait ce qui correspond à 3:1:1 et non à 2:1:1. Mais nous avons justement considéré un autre phénomène qui empêcherait les gènes de se réassortir librement pour donner lieu à des génotypes spécifiques; il s'agit du linkage. Sur la base de cette hypothèse, le premier croisement peut s'écrire

P $\frac{Bp}{Bp} \times \frac{bP}{bP}$

↓

F_1 $\frac{Bp}{bP}$

Si c'est le cas, quels seront les rapports attendus en F_2 ? Nous pourrions penser qu'une réponse à cette question dépend de la connaissance du nombre d'unité de carte génétique séparant les deux loci. C'est en effet concevable, mais pour avancer dans la solution du problème supposons que 20 unités de carte séparent les loci et voyons ce qui se produit (n' oubliez pas la démarche par approximations successives dans l' analyse d' un problème scientifique; elle est souvent utilisée !). Les prévisions pour la F_2 peuvent être envisagées comme suit, en vous rappelant qu'il n'y a point de crossing-over chez les mâles :

		Spermatozoïdes			
Oeufs		*Bp*	50%	*bP*	50%
Bp	10%	*BBPp*	5%	*BbPP*	5%
bp	10%	*Bbpp*	5%	*bbPp*	5%
Bp	40%	*BBpp*	20%	*BbPp*	20%
bP	40%	*BbPp*	20%	*bbPP*	20%

Globalement, les proportions entre phénotypes sont :

B – P –	5 + 5 + 20 + 20	= 50%
B – pp	5 + 20	= 25%
bbP –	5 + 20	= 25%
BBpp		= 0%

Ceci nous fournit précisément le rapport exigé, 2:1:1! Comment cela c'est-il produit ? Avons-nous eu la main heureuse en choisissant 20% comme pourcentage de recombinants? La réponse est non puisque tout autre choix de fréquence aurait conduit au même résultat (faites en l'essai par vous-même).

En conclusion, nous pouvons dire que le rapport est dû à l'hérédité de gènes liés en répulsion chez les parents, mais nous ne pouvons déterminer leur distance. Une cartographie précise demanderait un croisement-test.

Quoiqu'il s'agisse d'un problème complexe, la voie que nous avons suivie pour le résoudre nous a montré comment un ensemble de concepts différents peut être utilisé pour rejeter un nombre de possibilités et déboucher sur la solution la plus adéquate.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Chez *Drosophila*, l'allèle *b* correspond à un corps noir (normalement brun) ; l'allèle *wx*, d'un autre gène, désigne des ailes cireuses (normalement non-cireuses) ; et l'allèle *cn*, d'un troisième gène, des yeux de couleur cinabre (normalement rouge). Un individu femelle hétérozygote pour ces trois gènes est utilisé dans un croisement-test, et la descendance qui comporte 1000 individus se répartit comme suit : 5 normaux ; 6 noirs, cireux, cinabres ; 69 cireux, cinabres ; 67 noirs ; 382 cinabres ; 379 noirs, cireux ; 48 cireux ; et 44 noirs, cinabres.

a. Expliquez ces chiffres.

b. Indiquez la position des allèles sur les chromosomes du triple hétérozygote.

c. Si elle intervient dans le cadre de votre explication, calculez la valeur de l'interférence.

d. Si deux triples hétérozygotes du même type que celui décrit

ci-dessus sont croisés, quelle proportion de la descendance sera noire et cireuse ? (N'oubliez pas qu'il n'y a pas de crossing-over chez la drosophile mâle.)

Solution

a. Un bon conseil, déjà énoncé précédemment, est d'être méthodique. Ici il sera commode de commencer par établir la liste des phénotypes et des génotypes qui devraient y correspondre. Le croisement est un croisement-test du type

$$b^+/b\ wx^+/wx\ cn^+/cn \times b/b\ wx/wx\ cn/cn$$

Notez que les classes phénotypiques se présentent par paires, en termes de fréquence. Déjà, nous pouvons deviner que les classes les plus nombreuses (± 380) représentent les chromosomes parentaux, les deux classes d'environ 68 correspondent à des crossing-over simples dans une région, les deux classes d'environ 45 à des crossing-over simples dans l'autre région, et les deux dernières classes d'environ 5 sont issues de doubles crossing-over. Nous pouvons dès lors répartir les descendants en classes de gamètes provenant de la femelle :

b^+	wx^+	cn^+	382
b	wx	cn^+	379
b^+	wx	cn	69
b	wx^+	cn^+	67
b^+	wx	cn^+	48
b	wx^+	cn	44
b	wx	cn	6
b^+	wx^+	cn^+	5
			1000

Une fois les classes redisposées de cette façon, il nous est possible de confirmer que chaque paire de classes représente des génotypes réciproques issus respectivement de 0, 1 ou 2 crossing-over.

Nous ne connaissons pas a priori les parents de la femelle hétérozygote triple, de sorte qu'il semble à première vue difficile d'appliquer la définition de la recombinaison, où il faut comparer les génotypes gamétiques aux deux génotypes de départ qui ont produit l'hétérozygote. Mais à la réflexion, les seuls types parentaux compatibles avec les données présentées sont +/+ +/+ *cn/cn* et *b/b wx/wx* +/+, puisque ces classes demeurent les plus représentées.

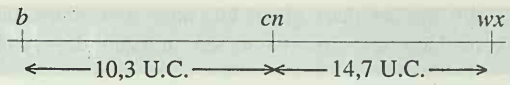
Nous pouvons dès lors calculer les fréquences de recombinaison. Pour

$$b - wx, \text{ la FR} = \frac{69 + 67 + 48 + 44}{1000} = 22{,}8\%$$

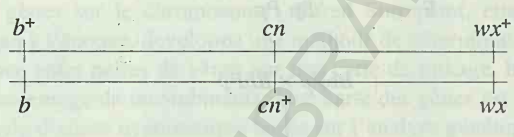
$$b - cn, \text{ la FR} = \frac{48 + 44 + 6 + 5}{1000} = 10{,}3\%$$

$$wx - cn, \text{ la FR} = \frac{69 + 67 + 6 + 5}{1000} = 14{,}7\%$$

La carte sera donc la suivante



b. Les chromosomes parentaux peuvent donc être visualisés de la façon suivante chez le triple hétérozygote



c. Le nombre de doubles recombinants attendus est de 0,103 × 0,147 × 1000 = 15,141. Le nombre de recombinants observés est de 6 + 5 = 11, de sorte que l'interférence I = 1 − 11/15,141 = 1 − 0,726 = 0,274 = 27,4 pour cent.

d. Il nous est demandé ici d'utiliser nos connaissances nouvellement acquises sur le linkage pour prédire le résultat d'un croisement déterminé. Il s'agit de prédire la fréquence des individus noirs et cireux dans la descendance d'une autofécondation (et non d'un croisement-test) du triple hétérozygote. Etant donné qu'il n'y a pas de crossing-over chez le mâle, la moitié des gamètes seront *b + wx*, et l'autre moitié + *cn* +, mais ces derniers ne peuvent donner lieu à un phénotype noir et cireux. Chez la femelle, deux types gamétiques sont susceptibles de fournir une descendance noire et cireuse : *b + wx* et *b cn wx*. La contribution des parents au phénotype noir et cireux est illustrée ici :

		gamètes ♀	
		b cn⁺ wx	*b cn wx*
gamètes ♂	*b cn⁺ wx*	*bb cn⁺ cn⁺ wx wx*	*bb cn⁺ cn wx wx*

Le type *b + wx* est un chromosome parental non-recombinant. Il y a en tout 382 + 379/1000 = 76.1 pour cent de tels chromosomes, parmi lesquels 38,05 seront *b + wx*. La fréquence de *b cn wx* sera de 11 : 2/1000 = 0,55 pour cent. Dès lors, la femelle produira au total 38,05 + 0,55 = 38,6 pour cent de gamètes capables de produire un descendant de type noir et cireux; la moitié de ceux-ci s'associeront avec les gamètes *b + wx* du mâle (l'autre avec + *cn* +), de sorte que la fréquence du type noir et cireux sera de 38,6/2 = 19,3 pour cent.

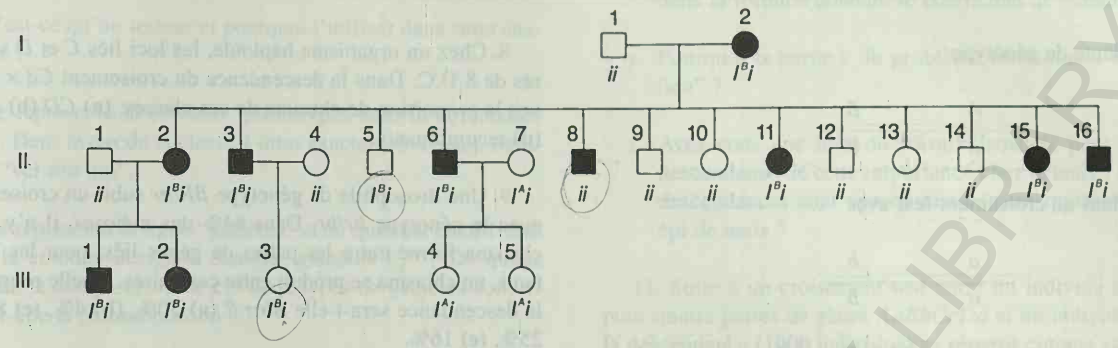
En résumé, la fusion des gamètes peut être représentée comme suit :

		gamètes ♀	
		38,05% *b cn⁺ wx*	38,05% *b cn₊ wx*
gamètes ♂	50% *b cn⁺ wx*	*bb cn⁺ cn⁺ wx wx*	*bb cn⁺ cn wx wx*

Descendance de type noir et cireux

2. L' arbre généalogique représenté ici montre la transmission d'un syndrome rare où les ongles et rotules sont simultanément difformes. Le génotype du groupe sanguin ABO de chaque individu est également donné. Les deux loci concernés sont autosomiques.

BCU IAC CENTRAL UNIT LIBRARY



a. Indiquez si le syndrome est dominant ou récessif. Pourquoi ?

b. Selon ce pedigree, le gène du syndrome et le gène du groupe sanguin ABO sont-ils liés? ? Justifiez votre réponse.

c. S'il y a linkage, dessinez les allèles sur la paire de chromosomes homologues appropriée des grands-parents. S'il n'y a pas de linkage, dessinez la configuration de deux paires homologues.

d. Selon votre modèle, quels descendants sont des recombinants ?

e. Quelle est la meilleure estimation de la FR ?

f. Si l'homme III-1 épouse une femme normale de type sanguin O, quelle est la probabilité que leur premier enfant soit de type sanguin B, et présente ce type de syndrome?

Solution

a. Ce syndrome est très probablement dominant. Il est présenté comme une anomalie rare, de sorte qu'il est peu probable que les personnes non-atteintes épousant un membre de cette famille, soient elles-mêmes porteuses de l'allèle présumé récessif de ce syndrome. Soit *N* l'allèle responsable. Dès lors, toutes les personnes ayant ce syndrome sont hétérozygotes *Nn* parce que toutes (et probablement la grand-mère aussi) sont issues d'un croisement avec un individu *nn* normal. Notez que le syndrome est présent dans trois générations successives - autre indication de son caractère dominant.

b. La liaison existe. Notez que la plupart des symboles noirs - ceux qui portent l'allèle *N* - portent également I^B; il est fort probable que ces allèles soient liés sur le même chromosome.

c. Les grands-parents doivent être

$$\frac{n\ \ i}{n\ \ i} \times \frac{N\ \ I^B}{n\ \ i}$$

(La grand-mère doit posséder les deux allèles récessifs afin de produire des descendants de génotype *ii* et *nn*).

d. Notez que le croisement de départ, concernant les grands-parents, équivaut à un croisement-test, de sorte que les recombinants à la génération II sont :

$$\text{n° 5 : } n\ I^B/\ n\ i \qquad \text{et} \qquad \text{n° 8 : } N\ i\ /n\ i$$

Tous les autres sont non-recombinants, étant soit $N\ I^B/n\ i$, soit $n\ i/n\ i$.

e. Remarquez que le croisement de départ, ainsi que les deux premiers croisements de la génération II sont identiques, et sont tous, bien sûr, des croisements-test. De ces trois croisements sont issus au total 16 descendants. Parmi ceux-ci, 3 sont des recombinants (II-5, II-8, et III-3). La fréquence de recombinaison est donc de $\frac{3}{16} = 18{,}8$ %. (Nous ne pouvons inclure le croisement II-6 × II-7, parce que sa descendance ne peut être scindée en recombinants et non-recombinants.)

f.

$$\text{(III-1 ♂)}\ \frac{N\ \ I^B}{n\ \ i} \times \frac{n\ \ i}{n\ \ i}\ \text{(normal, type O ♀)}$$

gamètes

81,2 %	$N\ I^B$	40,6 %	← Syndrome ongle-rotule, type sanguin B
	$n\ i$	40,6 %	
18,8 %	$N\ i$	9,4 %	
	$n\ I^B$	9,4 %	

Les deux premières classes parentales sont toujours égales, de même que les deux classes de recombinants. Par conséquent, la probabilité pour que le premier enfant ait le syndrome et le groupe sanguin B est de 40,6 %.

BCU LAUSANNE - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PROBLÈMES

1. Une plante de génotype

$$\frac{A \quad B}{a \quad b}$$

est utilisée dans un croisement-test avec

$$\frac{a \quad b}{a \quad b}$$

Si les deux loci sont séparés par 10 U.C., quelle proportion de la descendance sera *AaBb* ?

2. Les deux loci *A/a* et *D/d* sont liés au point qu'aucune recombinaison n'est jamais observée entre eux. Si *AAdd* est croisé avec *aaDD*, et les descendants (F_1) sont croisées entre eux, quels phénotypes seront observés en F_2, et dans quelles proportions ?

3. Les loci liés *R/r* et *S/s* sont séparés de 35 U.C. Si une plante de génotype

$$\frac{R \quad S}{r \quad s}$$

est autofécondée, quels phénotypes seront observés dans la descendance, et dans quelles proportions ?

4. A la suite du croisement *EEFF* × *eeff* la F_1 est croisée avec le parent récessif. Les génotypes de la descendance sont obtenus à partir des phénotypes. Ces génotypes, donnés sous la forme des gamètes du parent hétérozygote, s'observent dans les proportions suivantes :

Phénotype	Proportion
EF	$\frac{2}{6}$
Ef	$\frac{1}{6}$
eF	$\frac{1}{6}$
ef	$\frac{2}{6}$

Expliquez ces résultats.

5. Une souche de *Neurospora* ayant le génotype *HI* est croisée avec une souche ayant le génotype *hi*. La moitié de la descendance est *HI*, et l'autre moitié *hi*. Comment est-ce possible ?

6. Un animal femelle de génotype *AaBb* est croisé avec un mâle doublement récessif (*aabb*). Leur descendance se répartit comme suit : 442 *AaBb*, 458 *aabb*, 46 *Aabb* et 54 *aaBb*. Expliquez ces résultats.

7. Si *AABB* est croisé avec *aabb*, et la F_1 subit un croisement-test, quel pourcentage de la descendance sera-t-elle *aabb* si les 2 gènes sont **(a)** non-liés; **(b)** totalement liés (pas de crossing-over entre eux); **(c)** séparés par 10 unités de carte; **(d)** par 24 unités de carte ?

8. Chez un organisme haploïde, les loci liés *C* et *D* sont séparés de 8 U.C. Dans la descendance du croisement *Cd* × *cD*, trouvez la proportion de chacune de ces classes: **(a)** *CD* **(b)** *cd* **(c)** *Cd* **(d)** recombinants.

9. Une drosophile de génotype *BR/br* subit un croisement-test avec le génotype *br/br*. Dans 84% des méioses, il n'y a pas de chiasma formé entre les paires de gènes liés; pour les 16% restants, un chiasma se produit entre ces paires. Quelle proportion de la descendance sera-t-elle *Bbrr* ? **(a)** 50%, **(b)** 4%, **(c)** 84 %, **(d)** 25%, **(e)** 16%.

10. Un croisement-test à trois facteurs a été réalisé chez le maïs. Les résultats et une analyse partielle de la recombinaison sont présentés classiquement ci-dessous (p = feuilles pourpres, + = vertes ; v = plantules résistantes au virus, + = sensibles ; b= lunule brune sur le grain, + = uniforme). Utilisez ces données pour répondre aux questions posées.

P ++++++ × *ppvvbb*

Gamètes +++ *pvb*

F_1 + *p* + *v* + *b* × *ppvvbb* (testeur)

Classe	Phénotypes dans la descendance	Gamètes F1	Nombre	Type de recombinant *p-b*	*p-v*	*v-b*
1	ver sen uni	+ + +	3.210			
2	pou res bru	*p v b*	3.222			
3	ver res uni	+ *v* +	1.024		R	R
4	pou sen bru	*p* + *b*	1.044		R	R
5	pou res uni	*p v* +	690	R		R
6	ver sen bru	+ + *b*	678	R		R
7	ver res bru	+ *v b*	72	R	R	
8	pou sen uni	*p* + +	60	R	R	
			Total 10.000	1.500	2.200	3.436

a. Déterminez quels gènes sont liés.

b. Dessinez une carte en y impliquant les distances en U.C.

c. Calculez s'il y a lieu l'interférence.

Décomposons le problème

a. Dessinez schématiquement les parents, la F1, et les plantes de maïs utilisées comme testeur. Utilisez des flèches pour indiquer exactement comment vous réaliseriez l'expéreince. Montrez où les grains sont récoltés.

b. Pourquoi tous les + se ressemblent-ils, même s'il s'agit de gènes différents ? Pourquoi ceci ne prête-t-il pas à confusion ?

c. Comment un phénotype peut être à la fois pourpre et brun (par exemple).

BIBLIOTECA - UNIVERSITY LIBRARY

d. Est-il important que les gènes soient désignés dans l'ordre *p-v-b-* dans l'énoncé du problème ?

e. Qu'est-ce qu'un testeur et pourquoi l'utiliser dans cette analyse ?

f. Que représente la colonne "phénotypes dans la descendance". Dans le cas de la classe 1 dites exactement ce que signifie "ver sen uni".

g. Que représente la ligne "gamètes" et en quoi est ce différent de la colonne désignée comme "gamètes F_1" ? De quelle façon la comparaison de ces deux types de gamètes concerne-t-elle la recombinaison ?

h. Quelle méiose est principalement l'objet de cette étude ? Soulignez la sur votre dessin.

i. Pourquoi les gamètes du testeur ne sont-ils pas indiqués ?

j. Pourquoi n'y a-t-il que huit classes phénotypiques ? Certaines classes ne sont-elles pas représentées ?

k. Quelles classes (et en quelles proportions) seraient attendues si tous les gènes étaient situés sur des chromosomes séparés ?

l. A quoi correspondent les effectifs relatifs des quatres classes (deux très représentées, deux intermédiaires, deux intermédiaires, deux peu représentées) ?

m. Que pouvez-vous dire au sujet de l'ordre des gènes en examinant les classes phénotypiques et leurs fréquences ?

n. Quelle serait la répartition attendue des classes phénotypiques si seulement deux des gènes étaient liés ?

o. A quoi correspond le mot "facteur" dans un croisement-test à trois facteurs ? L'usage de ce terme implique-t-il qu'il y ait linkage ? A quoi ressemblerait un croisement-test à quatre facteurs ?

p. Quelle est la définition de *recombinant*; comment s'applique-t-elle ici ?

q. Expliquez les colonnes "type de recombinant" ?

r. Pourquoi n'y a-t-il que trois colonnes "types de recombinants" ?

s. Que signifient les R et comment les a-t-on déterminés ?

t. Quelle est la signification des totaux par colonne ? Comment les utilise-t-on ?

u. Quel est le test critique pour un cas de linkage ?

v. Qu'est ce qu'une unité de carte ? Equivaut-elle à un centimorgan ?

w. Dans un croisement-test à trois facteurs tel que celui-ci, pourquoi la F_1 et le testeur ne sont-ils pas considérés comme étant de type parental lors du calcul des recombinaisons (en un sens ce *sont* des parents.)

x. Quelle est la formule permettant d'estimer l'interférence ? Comment les fréquences "attendues" sont-elles calculées dans la formule donnant le coéfficient de coïncidence ?

y. Pourquoi la partie c du problème mentionne-t-elle "s'il y a lieu" ?

z. Avez-vous une idée du travail demandé pour obtenir une descendance de cette importance chez le maïs ? Combien de descendances sont approximativement représentées par un épi de maïs ?

11. Suite à un croisement-test entre un individu hétérozygote pour quatre paires de gènes *AaBbCcDd* et un individu *aabbccdd*, la descendance (1000 individus) se répartit comme suit :

aBCD	42
Abcd	43
ABCd	140
abcD	145
aBcD	6
AbCd	9
ABcd	305
abCD	310

a. Quelles sont les gènes liés?

b. Si deux lignées pures ont été croisées pour produire l'hétérozygote, quels étaient leurs génotypes ?

c. Dessinez la carte de liaison des gènes, en mentionnant l'ordre des gènes et les distances respectives.

d. Calculez s'il y a lieu la valeur de l'interférence.

12. Chez le momordique, *Echballium elaterium*, les sexes sont séparés (l'espèce est dioïque), et déterminés non pas par des chromosomes sexuels hétéromorphes, mais par des gènes spécifiques. Les gènes impliqués sont connus : *M* (fertilité mâle), *m* (stérilité mâle), *F* (stérilité femelle) et *f* (fertilité femelle). Dans les populations de cette plante, les individus peuvent être mâles (± 50%) ou femelles (± 50%). De plus, le type hermaphrodite existe, mais à très faible fréquence. Cette plante hermaphrodite présente à la fois des organes mâles et femelles.

a. Quel doit être le génotype d'une plante mâle ? (Indiquez les relations de liaison entre gènes).

b. Quel doit être le génotype d'une plante femelle ? (Indiquez les relations de liaison entre gènes).

c. Comment se maintient au sein de la population une proportion quasi égale de mâles et de femelles ?

d. Quelle est l'origine de cet hermaphrodite rare?

e. Pourquoi les hermaphrodites sont-ils rares ?

13. Chez l'homme un gène autosomique *N* provoque un syn-

BU MSJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

drome caractérisé par une difformité des ongles et des rotules. Suite au mariage de certaines personnes ayant les phénotypes (syndrome ongle-rotule, groupe sanguin *A*) et (pas de syndrome ou normal, groupe sanguin *O*), certains de leurs enfants naissent avec ce syndrome et le type sanguin *A*. Supposons que les enfants de ce phénotype se marient à leur tour et aient eux-mêmes des enfants. Quatre phénotypes sont observés dans cette seconde génération avec les pourcentages suivantes :

66% syndrome ongle-rotule, groupe sanguin *A*
16% normal, groupe sanguin *O*
9% normal, groupe sanguin *A*
9% syndrome ongle-rotule, groupe sanguin *O*

Analysez ces résultats en détail, en excpliquant les fréquences de ces quatre phénotypes .

14. En utilisant les données obtenues par Bateson et Punnett (Tableau 5-1), calculer la distance en U.C. séparant les gènes de la couleur et de la forme (Ceci peut vous demander de procéder par approximations successives).

15. Vous disposez d'une lignée de *Drosophila* homozygote pour les gènes autosomiques récessifs *a*, *b*, et *c* liés dans cet ordre. Vous croisez les femelles de cette lignée avec des mâles d'une lignée de type sauvage homozygote. Vous croisez ensuite les mâles de la F_1 hétérozygotes avec leurs soeurs hétérozygotes, et vous obtenez en F_2 la répartition de phénotypes suivante : 1364 +++, 365 *abc*, 87 *ab*+, 84 ++*c*, 47 *a*++, 44 +*bc*, 5 *a*+*c*, et 4 +*b*+.

a. Quelle est la fréquence de recombinaison entre *a* et *b* ? Entre *b* et *c* ?

b. Quel est le coefficient de coïncidence ?

16. R.A. Emerson réalisa chez le maïs un croisement entre deux lignées parentales pures différentes et obtint une F_1 hétérozygote pour trois gènes récessifs : *an* («anther»), *br* («brachytic»), et *f* («fine»). Il réalisa ensuite un croisement-test de la F_1 par l'homozygote triple récessif, et obtint les classes phénotypiques suivantes dans la descendance : 355 «anther», 339 «brachytic» et «fine», 88 type sauvage complet, 55 «anther» et «brachytic» et «fine», 21 «fine», 17 «anther et «brachytic» 2 «brachytic», et 2 «anther» et «fine».

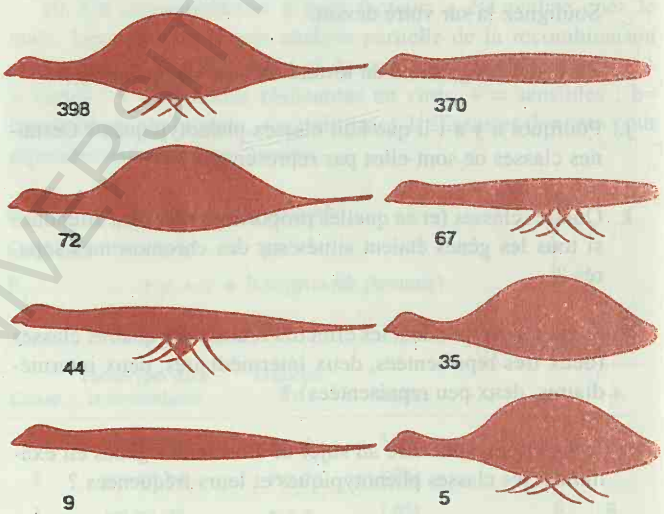
a. Quels étaient les génotypes des lignées parentales ?

b. Dessinez la carte de linkage pour illustrer les relations de linkage entre les trois gènes, ainsi que les distances (en U.C.) qui les séparent.

c. Calculez la valeur de l'interférence.

17. Chez le maïs, les paires alléliques suivantes ont été identifiées sur le chromosome 3 : +/*b* (renforcement de la couleur versus non-renforcement de la couleur), +/*lg* (avec ligule versus absence de ligule), et +/*v* (plante verte versus virescence). Un croisement-test entre triples récessifs et les plantes de la F_1 hétérozygotes pour ces trois mêmes gènes, a donné la descendance suivante 305 + *v lg*, 275 *b* + +, 128 *b* + *lg*, 112 + *v* +, 74 + + *lg*, 66 *b v* +, 22 + + +, et 18 *b v lg*. Donnez l'ordre de ces gènes sur le chromosome, la distance les séparant en U.C., et le coefficient de coïncidence.

18. Le groody est un organisme haploïde utile (mais fictif) utilisé comme outil en génétique. Le type sauvage chez le groody présente un corps adipeux, une longue queue, et des flagelles. Les autres lignées ont un corps mince, ou n'ont pas de queue, ou n'ont pas de flagelles. Les groodies peuvent se reproduire entre eux (mais ils sont si timides que nous ignorons comment), et produire des recombinants. Un groody de type sauvage est croisé avec un groody mince sans queue ni flagelles. Les 1000 bébés groodies issus de ce croisement, sont classés comme illustré dans la figure suivante.



Attribuez les génotypes, et localisez ces trois gènes sur la carte

(Problème 18 : due à l'amabilité de Burton S. Guttman).

19. Supposez que trois paires d'allèles sont rencontrées chez *Drosophila* : x^+et *x*, y^+et *y*, et z^+et *z*. Comme le représentent les symboles, chaque allèle non-sauvage est récessif par rapport à son allèle sauvage. Un croisement effectué entre des femelles hétérozygotes pour ces trois loci, et des mâles de type sauvage produit la descendance suivante : 1010 x^+ y^+ z^+ femelles, 430 x y^+ *z* mâles, 441 x^+ *y* z^+ mâles, 39 *x y z* mâles, 32 x^+y^+ *z* mâles, 30 x^+ y^+ z^+ mâles, 27 *x y* z^+ mâles; 1 x^+ *y z* mâle, et 0 *x* y^+z^+ mâles.

a. Quel chromosome de *Drosophila* porte ces gènes

b. Dessinez les chromosomes en cause du parent femelle hétérozygote, en situant les allèles.

c. Calculez les distances en U.C. entre les gènes, et le coefficient de coïncidence ?

20. En se basant sur les cinq ensembles de données reprises dans le tableau ci-contre, déterminez l'ordre des gènes en cause par simple inspection des données et donc sans calculer les fréquences de recombinaison. Les phénotypes récessifs sont symbolisés par des minuscules et les dominants par des plus.

EDUJASI UNIVERSITY LIBRARY

Phénotypes observés dans le croisement «test» à 3 facteurs	Ensemble de données 1	2	3	4	5
+++	317	1	30	40	305
++*c*	58	4	6	232	0
+*b*+	10	31	339	84	28
+*bc*	2	77	137	201	107
a++	0	77	142	194	124
a+*c*	21	31	291	77	30
ab+	72	4	3	235	1
abc	203	1	34	46	265

21. A partir des données phénotypiques mentionnées ci-dessous pour deux croisements-tests impliquant (1) *a*, *b*, et *c*, et (2) *b*, *c*, et *d*, déterminez l'ordre des quatre gènes *a*, *b*, *c*, et *d* et les distances entre chacun d'entre eux. Les phénotypes récessifs sont symbolisés par des minuscules et les dominants par des plus.

(1)		(2)	
+++	669	*bcd*	8
ab+	139	*b*++	441
a++	3	*b*+*d*	90
++*c*	121	+*cd*	376
+*bc*	2	+++	14
a+*c*	2,280	++*d*	153
abc	653	+*c*+	64
+*b*+	2,215	*bc*+	141

22. Chez *Drosophila,* l'allèle dp^+ détermine des ailes longues et *dp* des ailes courtes. Un autre gène e^+, situé à un locus différent, détermine un corps gris et *e* un corps noir d'ébène. Les deux loci sont autosomiques. Les croisements suivants ont été réalisés, à partir des lignées pures parentales.

P ailes longues, corps ébène ♀ × ailes courtes, corps gris ♂

F_1 ailes longues, corps gris ♀ × ailes courtes, corps ébène ♂ (lignée pure testeur)

F_2		
	ailes longues, corps ébène	54
	ailes longues, corps gris	47
	ailes courtes, corps gris	92
	ailes courtes, corps ébène	47
		200

Utilisez le test χ^2 pour déterminer si ces loci sont liés, en établissant **(a)** l'hypothèse, **(b)** le calcul du χ^2, **(c)** la valeur du p, **(d)** la signification de la valeur de p, **(e)** la conclusion, **(f)** la constituon chromosomique des parents, de la F_1, du testeur et de la descendance.

23. Deux souches de levure haploïde porteuses de deux allèles non-sauvages ont été croisées pour déterminer si les gènes en cause étaient liés. La souche A se caractérise par un besoin en aspartate *(asp)* et l'incapacité d'utiliser le glucose (*gal*); la souche B est sensible aux radiations (*rad*) et exige des acides aminés aromatiques dans son milieu de culture (*aro*). Les génotypes de la descendance haploïde obtenue ont été établis ce qui donne les résultats suivants (+ désigne des allèles sauvages) :

Génotype				Fréquence
asp	*gal*	+	+	0,136
asp	+	+	*rad*	0,136
asp	*gal*	+	*rad*	0,064
asp	+	+	+	0,064
+	*gal*	*aro*	+	0,136
+	+	*aro*	*rad*	0,136
+	*gal*	*aro*	*rad*	0,064
+	+	*aro*	+	0,064
asp	*gal*	*aro*	+	0,034
asp	+	*aro*	*rad*	0,034
asp	*gal*	*aro*	*rad*	0,016
asp	+	*aro*	+	0,016
+	*gal*	+	+	0,034
+	+	+	*rad*	0,034
+	*gal*	+	*rad*	0,016
+	+	+	+	
				1.000

a. Calculez les six fréquences de recombinaison possibles.

b. Dessinez une carte de linkage illustrant l'emplacement des quatre loci et indiquez les distances en unités de carte.

24. Chez la souris, un croisement a été effectué entre une lignée pure femelle, sauvage pour la couleur des yeux et du corps et une lignée pure mâle à yeux abricot (dus à l'allèle *a*) et pelage gris (dû à l'allèle *g*). La F_1 est de type sauvage. Les individus F_1 se croisent entre eux et donnent une F_2 dont la composition est la suivante

femelles	toutes sauvages	
mâles	sauvage	45%
	abricot, gris	45%
	gris	5%
	abricot	5%

a. Expliquez ces fréquences.

b. Donnez les génotypes des parents, et des F_1 et F_2 pour les deux sexes.

25. La mère d'une famille de dix enfants est de type sanguin Rh^+. Elle présente également une caractéristique assez rare, l'elliptocytose (phénotype E), qui provoque l'apparition de globules rouges ovales au lieu de ronds, mais sans effets cliniques défavorables. Le père est Rh^- (n'a pas l'antigène Rh^+) et ses globules rouges sont normaux (*e*). Les enfants se répartissent comme suit :

UNIVERSITY LIBRARY

1 Rh^+ *e*, 4 Rh^+ *E* et 5 Rh^- *e*. Les génotypes des grands-parents maternels sont connus : Rh^+ *E* et Rh^- *e*. Un des dix enfants (Rh^+ *E*) épouse une personne de génotype Rh^+ *e*, et le couple a un enfant de génotype Rh^+ *E*.

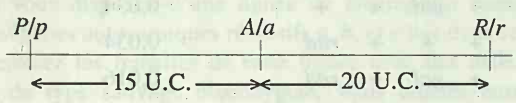
a. Dessinez la généalogie de toute la famille.

b. Cette généalogie correspond-t-elle à l'hypothèse selon laquelle Rh^+ est dominant et Rh^- est récessif ?

c. Quel est le mode de transmission de l'elliptocytose ?

d. Les gènes *E* et Rh pourraient-ils être situés sur le même chromosome ? Dans l'affirmative, estimez la distance les séparant en U.C., et commentez votre résultat.

26. Le père de M. Spock, premier officier du navire intergalactique Entreprise, venait de la planète Vulcan; sa mère venait de la Terre. Un Vulcanien a les oreilles pointues (*P*), n'a pas de glandes surrénales (synthèse de l'adrénaline, *A*), et porte le coeur à droite (*R*). Tous ces allèles sont dominants par rapport aux allèles terriens normaux. Ces gènes sont autosomiques, et sont liés entre eux dans l'ordre ci-dessous :



Si M. Spock épouse une Terrienne et qu'il n'y a pas d'interférence (génétique), quelle proportion de leurs enfants :

a. Présenteront les trois caractéristiques vulcaniennes ?

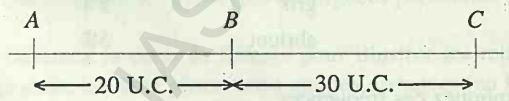
b. Présenteront les trois caractéristiques terriennes ?

c. Auront les oreilles et le coeur de Vulcaniens mais les glandes surrénales de Terriens ?

d. Auront les oreilles de Vulcaniens mais le coeur et les glandes surrénales de Terriens ?

(Problème 26 extrait de D. Harrsison, Problems in Genetics. Addison-Wesley, 1970).

27. Chez une certaine plante diploïde, les trois loci *A*, *B*, et *C* sont liés comme ci-dessous :



Vous disposez d'une plante (la plante parentale) de génotype *Abc/aBC*.

a. En l'absence d'interférence, si la plante est autofécondée, quelle proportion de la descendance sera de génotype *abc/abc* ?

b. En l'absence d'interférence, si la plante parentale est croisée avec une plante de génotype *abc/abc*, quelles classes génotypiques se retrouveront dans la descendance? Avec quelle fréquence, si la descendance comporte 1000 individus ?

c. Recommencez la question b., en tenant compte cette fois de 20% d'interférence entre les régions.

28. Les individus de la F_1 de génotype *AaBb* issus de plusieurs croisements de type *AA BB* x *aa bb*, ont été soumis au croisement-test avec des individus *aa bb*. Les résultats sont repris ci-contre.

Croisement-test de la F_1 du croisement	Nombre d'individus de génotype			
	AaBb	*aabb*	*Aabb*	*aaBb*
1	310	315	287	288
2	36	38	23	23
3	360	380	230	230
4	74	72	50	44

Pour chaque cas, utilisez le test du χ^2 pour décider de l'existence ou non d'une liaison.

29. Certaines variétés de lin présentent des résistances différentes à des races spécifiques d'un champignon appelé la rouille du lin. Par exemple la variété 770B est résistante à la race de rouille n° 24 mais sensible au n° 22, alors que la variété de lin Bombay est résistante à la race de rouille n° 22 mais sensible au n° 24. Lorsque ces deux variétés sont croisées entre elles, la F_1 hybride qui en résulte est résistante aux deux races de rouille. Lorsqu'elle est autofécondée, elle produit une F_2 au sein de laquelle les proportions phénotypiques sont les suivantes :

		Race de rouille 22	
		Résistant	Sensible
Race de rouille 24	Résistant	184	63
	Sensible	58	15

a. Proposez une hypothèse qui expliquerait chez le lin la base génétique de la résistance à certaines races particulières de la rouille. Enoncez votre hypothèse de façon aussi concise que possible, et définissez tous les symboles utilisés. Quel est le génotype correspondant aux plantes de lin 770B, Bombay, F_1 et F_2 ?

b. Testez votre hypothèse en utilisant le test χ^2. Etablissez les valeurs attendues, la valeur du χ^2 (à deux décimales près), et la valeur de la probabilité p. Expliquez clairement la signification de cette valeur *p*. Acceptez-vous ou non, votre hypothèse sur base du test du χ^2?

30. Voici deux arbres généalogiques dans lesquels les symboles à barres verticales désignent une déficience en sulphatase stéroïdiale et les barres horizontales une déficience en ornithine transcarbamylase.

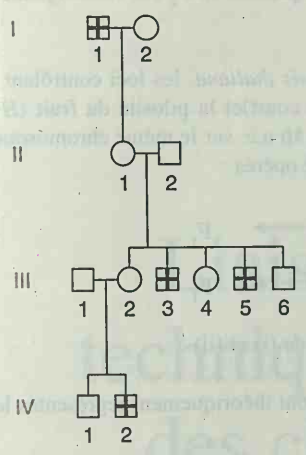
a. Y-a-t-il dans ces arbres généalogiques une indication que les gènes responsables des déficiences soient linkés ?

b. S'ils le sont, pouvez-vous déceler dans la généalogie l'existence entre eux d'un crossing-over?

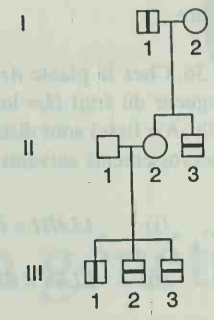
ECUASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

c. Donnez les génotypes de ces individus autant que faire se peut.

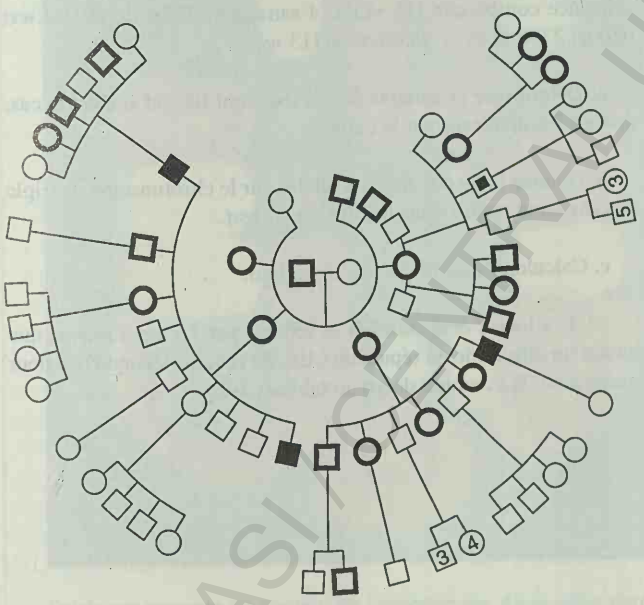
Généalogie 1



Généalogie 2



31. L'arbre généalogique suivant concerne une famille comportant deux phénotypes anormaux rare, la sclérose bleue (une déficience caractérisée par des os fragiles), représentée par des symboles à bordure noire, et l'hémophilie représentée par du noir au centre des symboles. Les individus souffrant des deux anomalies sont représentés par des symboles complètement noirs.



a. Quel est le mode de transmission héréditaire de chacune de ces anomalies dans cet arbre généalogique en vous référant à l'arbre généalogique.

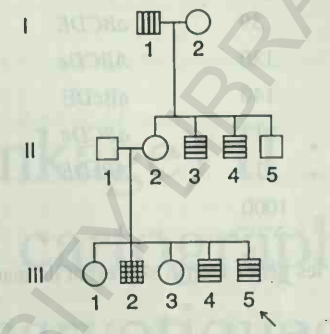
b. Déduisez-en le plus de génotypes possibles à attribuer aux membres de la famille.

c. Y-a-t-il une indication en faveur d'un cas de linkage ?

d. Y-a-t- il une indication en faveur d'un cas d'assortiment indépendant ?

e. Est-ce que quelconque des membres de la famille peut être considérée comme recombinant (c'est-à- dire obtenu à partir d'au moins un gamète recombinant) ?

32. Dans la généalogie suivante, le daltonisme «protan» est représenté par des lignes verticales, et le daltonisme «deutan» par des lignes horizontales. Il s'agit de deux conditions différentes de mauvaise perception des couleurs chacune due à un gène distinct.

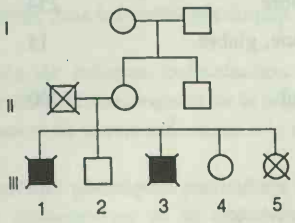


a. Une liaison génétique est-elle évidente ?

b. Si c'est le cas, avez-vous une indication de l'existence d'un crossing-over ? Expliquez ces deux réponses à l'aide d'un diagramme.

c. Pouvez-vous calculer une fréquence de recombinaison entre ces gènes ? S'agit-il d'une forme de recombinaison intra- ou inter-chromosomique ?

33. Chez l'homme, les gènes du daltonisme et de l'hémophilie se situent sur le chromosome X, et présentent une fréquence de recombinaison d'environ 10%. La liaison entre un gène pathologique et un gène relativement inoffensif peut s'avérer très utile pour un pronostic génétique. Quelques individus dont la généalogie est bien connue sont représentés ci-contre . Les symboles noirs indiquent l'hémophilie et les croix le daltonisme.



Quel conseil donneriez-vous aux femmes III4 et III5 quant à la probabilité qu'elles aient un fils hémophile ?

(Le problème 33 est adapté de J.F. Crow, *Genetics Notes : An Introduction to Genetics*, Burgess Publishing 1983.).

34. Un généticien étudiant la position des gènes *A*, *B*, *C*, *D*, et *E* réalise deux croisements-tests à trois facteurs

Le premier croisement entre lignées pures. est

$$AABBCCDDEE \times aabbCCddEE$$

Le deuxième croisement de lignées pures est

$$AABBCCDDEE \times aaBBccDDee$$

Dans les deux cas, le généticien croise la F_1 à un testeur récessif et classe les descendances selon la contribution génétique de la F_1.

Croisement 1		Croisement 2	
ABCDE	316	*ABCDE*	243
abCde	314	*aBcDe*	237
ABCdE	31	*ABcDe*	62
abCDE	39	*aBCDE*	58
AbCdE	130	*ABCDe*	155
aBCDE	140	aBcDE	165
AbCDE	17	*aBCDe*	46
aBCdE	13	*ABcDE*	34
	1000		1000

On sait aussi que les gènes *D* et *E* ségrègent de manière indépendante.

a. Dessinez la carte de ces gènes, et donnez, si possible, les distances en unités de carte.

b. Existe-t-il'une possibilité d' interférence ?

35. Chez *Arabidopsis thaliana* , une petite crucifère, un nouveau phénotype "glabre" (dépourvu de poils) a été découvert. Il est dû à un gène récessif (*gg*). On possède des raisons de penser que le locus G est situé sur le chromosome 4, de sorte qu'une plante *gg* fut croisée avec une plante de génotype *yy* (plante jaune, dû à un manque de chlorophylle) dont le locus est situé sur le chromosome 4. La F_1 est de phénotype sauvage; elle fut autofécondée ce qui donna lieu à la descendance F_2 suivante :

type sauvage	514
jaune	237
glabre	234
jaune, glabre	15
total	1000

a. Le locus *G* est-il bien sur le chromosome 4 ?

b. Si c'est le cas, estimez le nombre d'u.c. entre *G* et *Y*.

c. Expliquez la raison des fréquences en F_2 des classes jaune et glabre.

36. Chez la plante *Arabidopsis thaliana*, les loci contrôlant la longueur du fruit (*L*= long, *l* = court)et la pilosité du fruit (*H* = poilu, *h* = lisse) sont distants de 16 u.c. sur le même chromosome. Les croisements suivants ont été opérés :

(i) $LLHH \times llhh \longrightarrow F_1$

(ii) $LLhh \times llHH \longrightarrow F_1$

Si l'on croise les F1 respectives de (i) et (ii)

a. Dans quelle proportion seront théoriquement représentés les *llhh* dans la descendance ?

b. Dans quelle proportion seront théoriquement représentés les *Llhh* dans la descendance ?

37. Chez le maïs on a obtenu un triple hétérozygote porteur des allèles mutants *sh* (grain ratatiné), *w* (aleurone incolore) et *wx* (albumen cireux), tous associés à leurs allèles sauvages normaux. Ce triple hétérozygote a été utilisé dans un croisement-test. La descendance comportait 116 *sh,wx*; 4 sauvages; 2538 *sh*; 601 *sh,wx*; 626 *w*; 2706 *w,wx*; 2 *sh,w,wx*; et 113 *wx*.

a. Déterminez si certains de ces loci sont liés, et si c'est le cas, donnez les distances sur la carte.

b. Donnez la disposition des allèles sur le chromosome du triple hétérozygote utilisé dans le croisement-test.

c. Calculez l'interférence, s'il y a lieu.

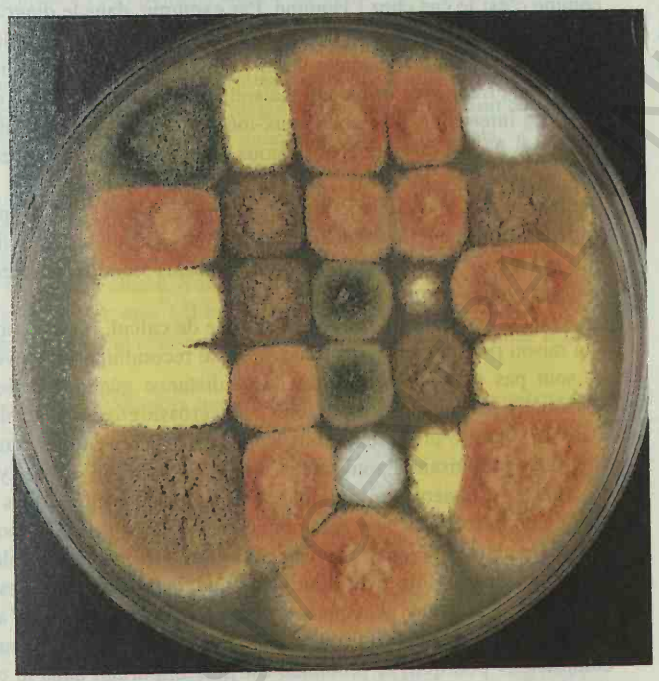
38. Les loci *A* et *B* sont liés et séparés par 10 u.c. Prouvez que lorsqu'un dihybride en répulsion (*Ab/aB*) est autofécondé la valeur *z* sera de 0.002 comme décrit au tableau 5-2.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

6

Liaison génétique (linkage) II : techniques spéciales de cartographie des chromosomes eucaryotiques



Quelques variants de couleur de l'ascomycète *Aspergillus* dont la couleur normale est vert foncé. Les allèles responsables de l'apparition de ces couleurs ont servi de marqueurs dans l'étude du crossing-over mitotique, un des sujets abordés dans ce chapitre. Ces couleurs sont dues à des pigments produits à différents stades de la série de réactions biochimiques de la biosynthèse du pigment vert sombre. (J. Peberdy, Département des Sciences de la Vie, Université de Nottingham, Grande-Bretagne)

CONCEPTS-CLÉS

- La formation de crossing-over doubles ou multiples entraîne une sous-estimation des distances cartographiques exprimées en termes de fréquences de recombinaison.
- Il est possible de corriger cet effet des doubles crossing-over en utilisant des formules de cartographie particulières.
- Chez certains ascomycètes, l'analyse de méioses individuelles permet d'introduire les centromères dans les cartes génétiques.
- L'analyse de méioses individuelles met en lumière les différents aspects de la ségrégation des gènes et de la recombinaison à la méiose.
- Des systèmes génétiques particuliers révèlent que le crossing-over et le réassortiment de gènes peuvent parfois se produire dans des cellules diploïdes en cours de *mitose*.

BOSTON UNIVERSITY LIBRARY

Dans le chapitre 5, nous avons appris la méthode de base de la cartographie génétique des chromosomes eucaryotiques. Cette méthode consiste à mesurer la fréquence de recombinaison dans un échantillon aléatoire de produits de la méiose et à partir de là, à déterminer le degré de liaison des gènes considérés. Dans ce chapitre, nous étendrons l'analyse au delà des trois concepts-clés contenus dans la phrase précédente, à savoir :

la fréquence de recombinaison,

un échantillon aléatoire de produits

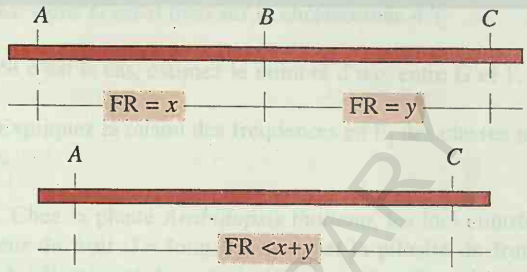
la méiose.

Considérons d'abord la fréquence de recombinaison. Nous verrons que la fréquence de recombinaison ne donne pas toujours une mesure précise de la distance cartographique et qu'il faut parfois introduire des corrections. En second lieu, il y a les produits aléatoires. Certains organismes, grâce à la façon dont ils terminent leur cycle vital, permettent au généticien d'étudier les produits de méioses individuelles et ainsi d'analyser la recombinaison d'une façon que ne permet pas l'étude d'échantillons aléatoires de produits méiotiques. Enfin, la méiose. Cela peut paraître surprenant que des gènes puissent se recombiner à la mitose. Néanmoins, cela se produit dans certains cas, ce qui permet de développer certaines méthodes de cartographie très importantes.

La cartographie des chromosomes est une des activités principales des généticiens. Le but de la génétique n'est-il pas, après tout, de comprendre la structure, le fonctionnement et l'évolution du génome ? L'établissement de la localisation des gènes constitue bien évidemment une partie essentielle de cette tâche. Les concepts présentés dans ce chapitre font partie du vocabulaire de tous les jours de la génétique. De la même façon que nous avons précédemment dû étendre les règles de base de la ségrégation mendélienne, nous devons à présent élargir les règles de base de la cartographie.

Le calcul précis de grandes distances cartographiques

Au chapitre 5, nous avons défini l'unité de cartographie génétique (u.c.) comme étant une fréquence de recombinaison (FR) de 1 pour cent. Cette unité fondamentale très utile a résisté à l'épreuve du temps et s'utilise toujours en génétique. Toutefois, plus la fréquence de recombinaison est élevée, moins elle constitue une mesure précise de la distance génétique. En fait, les distances cartographiques calculées à partir de fréquences de recombinaison élevées sont plus petites que celles obtenues à partir de fréquences de recombinaison plus faibles ! Voici la démonstration de cet effet que nous avons déjà observé dans des exemples du chapitre précédent. Typiquement, quand on mesure la recombinaison entre trois loci liés, la somme des deux fréquences de recombinaison internes est plus grande que la fréquence de recombinaison entre les loci externes, comme le montre le diagramme suivant



Si l'on veut utiliser ces données, quelle est l'estimation la plus-correcte de la distance entre les loci externes *A* et *C* ? La réponse est que *x+y* est une estimation plus correcte que la valeur plus petite mesurée directement entre *A* et *C*. Ceci nous permet de poser un principe utile pour la cartographie

Message Les meilleures estimations des distances cartographiques s'obtiennent en additionnant les distances calculées pour des intervalles courts.

Toutefois, que faire si nous ne disposons pas de marqueurs internes qui nous permettent de décomposer un intervalle ? C'est une situation courante quand on entreprend de cartographier un nouvel organisme expérimental ou quand le génome est immense comme c'est le cas chez l'Homme. Par exemple, dans le diagramme ci-dessus, que faire s'il n'existait pas de locus *B* connu ? Devrions nous nous contenter de la valeur obtenue directement à partir de la fréquence de recombinaison entre *A* et *C* ? De plus, que faire des intervalles plus courts eux-mêmes ? S'il y avait d'autres loci entre *A* et *B* et entre *B* et *C*, nous pourrions obtenir une estimation encore meilleure de la distance entre *A* et *C*. Heureusement, il existe une formule qui permet de calculer à partir de n'importe quelle fréquence de recombinaison une estimation plus précise de la distance cartographique, sans recourir à la mesure d'intervalles de plus en plus petits.

Avant d'établir cette nouvelle méthode de calcul, réfléchissons à la raison pour laquelle des fréquences de recombinaison élevées ne sont pas de bonnes mesures de la distance génétique. Nous avons déjà rencontré les coupables : les crossing-over multiples. Dans le chapitre précédent, nous avons vu que les doubles crossing-over produisaient souvent un arrangement allélique de type parental et n'étaient par conséquent pas pris en compte dans la mesure de la fréquence de recombinaison. Il en va de même pour les autres classes de crossing-over multiples : triples, quadruples, etc. Tous ces crossing-over multiples conduisent à une sous-estimation de la distance génétique et comme ils se produisent d'autant plus fréquemment que les intervalles sont plus longs, nous comprenons pourquoi le problème est plus important dans le cas des fréquences de recombinaison élevées.

Comment pouvons nous tenir compte de ces crossing-over multiples en calculant les distances cartographiques ? Il faut que nous disposions d'une fonction mathématique qui relie de façon exacte la fréquence de recombinaison et la distance génétique. En d'autres termes, nous devons disposer d'une **fonction cartographique**.

Message La fonction cartographique fournit une mesure de la distance cartographique réelle à partir de la fréquence de recombinaison, corrigée pour tenir compte des crossing-over multiples.

La distribution de Poisson

Pour calculer la fonction cartographique, nous aurons recours à un outil mathématique fréquemment utilisé en analyse génétique parce qu'il décrit bien de nombreux phénomènes génétiques. Cet outil est appelé **distribution de Poisson**. Une distribution est tout simplement une façon de décrire les fréquences de différentes classes d'échantillons. La distribution de Poisson décrit la fréquence des classes d'échantillons contenant 0, 1, 2, 3, 4... i événements quand le nombre moyen d'événements par classe est petit par rapport au nombre total de fois que l'événement est susceptible de se produire. Par exemple, le nombre de têtards qu'il est *possible* de pêcher d'un seul coup de filet dans un étang est très élevé, mais la plupart des coups de filets n'en ramèneront qu'un ou deux, voire même aucun. Le nombre d'oiseaux trouvés morts sur le bord d'une grand-route est potentiellement très élevé, mais si l'on considère un échantillon d'un kilomètre, ce nombre est généralement petit. De tels échantillonnages sont bien représentés par la distribution de Poisson.

Prenons un exemple numérique. Supposons que nous distribuions 100 billets de 100 francs à 100 étudiants dans une salle de cours, en les éparpillant dans toute la classe à partir d'un point situé près du plafond. Le nombre moyen de billets par étudiant (la moyenne) est 1.0, mais il tombe sous le sens qu'il est très peu probable que chacun des 100 étudiants attrape un billet. Nous nous attendrions à ce que quelques étudiants chanceux s'emparent chacun de trois ou quatre billets et à ce qu'un certain nombre d'entre eux en attrapent deux. Toutefois, nous nous attendrions à ce que la majorité des étudiants récolte un billet ou même aucun. La distribution de Poisson nous fournit une prédiction quantitative de ces résultats.

Dans cet exemple, l'événement pris en compte est la capture d'un billet par un étudiant. Nous allons répartir les étudiants en classes, selon le nombre d'événements qui se sont produits (le nombre de billets capturés par étudiant), et déterminer la fréquence de chaque classe. Soit m le nombre moyen d'événements (dans le cas présent, $m = 1.0$ billet par étudiant) et i le nombre d'événements dans une classe déterminée (disons que $i = 3$ pour les étudiants qui ont capturé chacun 3 billets). Représentons par $f(i)$ la fréquence de la classe à i événements, c'est-à-dire la proportion des étudiants qui capturent chacun i billets. L'énoncé général de la distribution de Poisson dit que

$$f(i) = \frac{e^{-m} m^i}{i\,!}$$

e étant la base des logarithmes naturels ($e \cong 2{,}7$) et ! le symbole factoriel (exemples : $3\,! = 3 \times 2 \times 1 = 6$ et $4\,! = 4 \times 3 \times 2 \times 1 = 24$; par définition, $0\,! = 1$). Lors du calcul de $f(0)$, rappelons-nous que n'importe quel nombre élevé à la puissance 0 est égal à 1. Le tableau 6-1 donne les valeurs de e^{-m} pour les valeurs de m comprises entre 0,000 et 1,000.

Dans notre exemple, $m = 1{,}0$. En nous servant du tableau 6-1, nous calculons comme suit les fréquences des classes d'étudiants qui capturent chacun 0, 1, 2, 3, et 4 billets :

$$f(0) = \frac{e^{-1}\,1^0}{0\,!} = \frac{e^{-1}}{1} = 0{,}368$$

$$f(1) = \frac{e^{-1}\,1^1}{1\,!} = \frac{e^{-1}}{1} = 0{,}368$$

$$f(2) = \frac{e^{-1}\,1^2}{2\,!} = \frac{e^{-1}}{2 \times 1} = 0{,}184$$

$$f(3) = \frac{e^{-1}\,1^3}{3\,!} = \frac{e^{-1}}{3 \times 2 \times 1} = 0{,}061$$

$$f(4) = \frac{e^{-1}\,1^4}{4\,!} = \frac{e^{-1}}{4 \times 3 \times 2 \times 1} = 0{,}015$$

La figure 6-1 nous montre cette distribution représentée sous forme d'histogramme. Nous prédisons qu'environ 37 étudiants n'attraperont aucun billet, 37 environ en attraperont un, 18 environ

Tableau 6-1. Valeurs de e^{-m} pour les valeurs de m comprises entre 0 et 1

m	e^{-m}	m	e^{-m}	m	e^{-m}	m	e^{-m}
0,000	1,00000	0,250	0,77880	0,500	0,60653	0,750	0,47237
0,010	0,99005	0,260	0,77105	0,510	0,60050	0,760	0,46767
0,020	0,98020	0,270	0,76338	0,520	0,59452	0,770	0,46301
0,030	0,97045	0,280	0,75578	0,530	0,58860	0,780	0,45841
0,040	0,96079	0,290	0,74826	0,540	0,58275	0,790	0,45384
0,050	0,95123	0,300	0,74082	0,550	0,57695	0,800	0,44933
0,060	0,94176	0,310	0,73345	0,560	0,57121	0,810	0,44486
0,070	0,93239	0,320	0,72615	0,570	0,56553	0,820	0,44043
0,080	0,92312	0,330	0,71892	0,580	0,55990	0,830	0,43605
0,090	0,91393	0,340	0,71177	0,590	0,55433	0,840	0,43171
0,100	0,90484	0,350	0,70469	0,600	0,54881	0,850	0,42741
0,110	0,89583	0,360	0,69768	0,610	0,54335	0,860	0,42316
0,120	0,88692	0,370	0,69073	0,620	0,53794	0,870	0,41895
0,130	0,87810	0,380	0,68386	0,630	0,53259	0,880	0,41478
0,140	0,86936	0,390	0,67706	0,640	0,52729	0,890	0,41066
0,150	0,86071	0,400	0,67032	0,650	0,52205	0,900	0,40657
0,160	0,85214	0,410	0,66365	0,660	0,51685	0,910	0,40252
0,170	0,84366	0,420	0,65705	0,670	0,51171	0,920	0,39852
0,180	0,83527	0,430	0,65051	0,680	0,50662	0,930	0,39455
0,190	0,82696	0,440	0,64404	0,690	0,50158	0,940	0,39063
0,200	0,81873	0,450	0,63763	0,700	0,49659	0,950	0,38674
0,210	0,81058	0,460	0,63128	0,710	0,49164	0,960	0,38289
0,220	0,80252	0,470	0,62500	0,720	0,48675	0,970	0,37908
0,230	0,79453	0,480	0,61878	0,730	0,48191	0,980	0,37531
0,240	0,78663	0,490	0,61263	0,740	0,47711	0,990	0,37158
						1,000	0,36788

ECUMST / CENTRE UNIVERSITAIRE

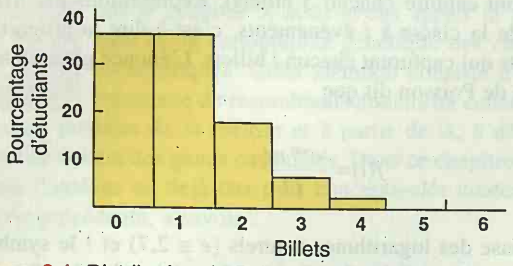


Figure 6-1. Distribution de Poisson correspondant à une moyenne de 1,0. L'exemple choisi est celui d'une distribution aléatoire de billets de cent francs à des étudiants.

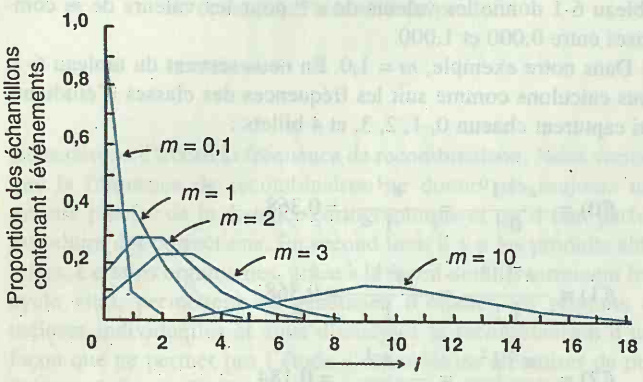


Figure 6-2. Distributions de Poisson pour cinq valeurs moyennes différentes : *m* est le nombre moyen d'événements par échantillon, et *i* est le nombre d'événements observés par échantillon. (Extrait de R.R. Sokal et F.J. Rohlf, *Introduction to Biostatistics*. Copyright © 1973, W.H. Freeman and Company.)

en auront deux, six environ auront trois billets et deux environ en auront quatre. Nous rendons compte ainsi de la totalité des cent étudiants ; en effet, vous pouvez vérifier que la distribution de Poisson donne $f(5) = 0{,}003$, indiquant ainsi une probabilité nulle qu'un étudiant récolte cinq billets.

Des distributions similaires peuvent être déterminées pour d'autres valeurs de *m*. Quelques unes sont représentées sur la figure 6-2, sous forme de courbes cette fois, et non plus d'histogrammes.

Etablissement de la fonction cartographique

La formation de crossing-over le long d'un chromosome pendant la méiose peut également être décrite par la distribution de Poisson. Quelle que soit la région chromosomique considérée, le nombre de crossing-over qui s'y produisent effectivement est probablement petit par rapport au nombre total des possibilités offertes. Si nous connaissions le nombre *moyen* de crossing-over par méiose dans cette région, nous pourrions calculer la distribution des méioses à zéro, un, deux, trois, quatre et davantage de crossing-over. Toutefois, cela n'est pas nécéssaire dans le contexte où nous nous trouvons, parce que, comme nous allons le voir, la seule classe qui nous intéresse vraiment est la classe zéro. La raison en est que nous voulons établir la corrélation entre distances réelles et valeurs observables de FR. Or il se fait que les méioses au cours desquelles se produisent un, deux, trois, quatre ou *n'importe quel* nombre fini de crossing-over se comportent dans leur ensemble de façon semblable, en ce sens qu'elles se soldent par une FR de 50 pour cent *parmi leurs produits*, alors que les méioses sans crossing-over produisent une FR de 0 pour cent. Par conséquent, le facteur déterminant dans les valeurs réelles de FR est le rapport de la classe zéro à l'ensemble des autres. Démontrons la validité de ce raisonnement en dessinant des méioses dans lesquelles ont lieu respectivement zéro, un et deux crossing-over entre chromatides non-sœurs. La figure 6-3 nous montre que la seule façon d'obtenir un produit recombinant à l'issue d'une méiose est qu'il y ait *au moins un* crossing-over dans la région considérée. Dans ce cas, la moitié exactement des produits de telles méioses, et *toujours* exactement la moitié, seront des recombinants. Remarquez que dans la figure 6-3, nous ne dessinons de crossing-over qu'entre chromatides non-sœurs ; l'**échange entre chromatides sœurs** est considéré comme extrêmement rare à la méiose. On peut montrer que s'il se produit, il n'influence pas le résultat final des analyses méiotiques.

Nous voici en mesure d'établir la fonction cartographique. Les recombinants constitueront la moitié des produits des méioses au cours desquelles au moins un crossing-over a lieu dans la région qui nous intéresse. La proportion de méioses à un crossing-over au

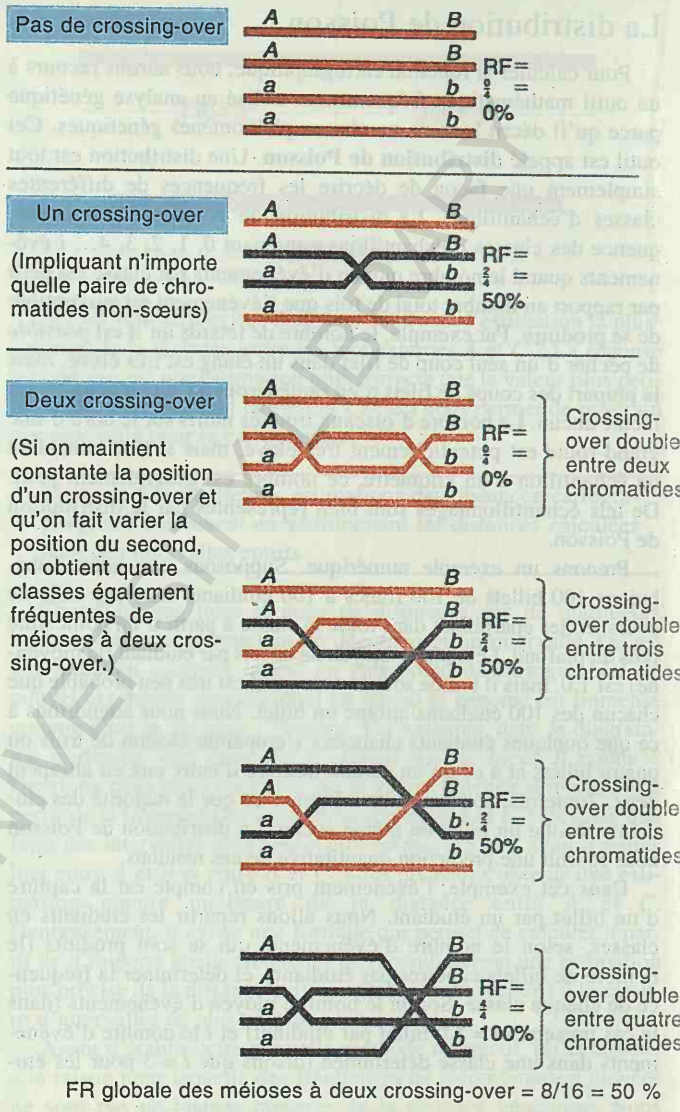


Figure 6-3. Démonstration de ce que la FR globale est de 50 pour cent pour toutes les méioses au cours desquelles un nombre de crossing-over différent de zéro se produit. Les lignes colorées représentent les chromatides recombinantes.

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

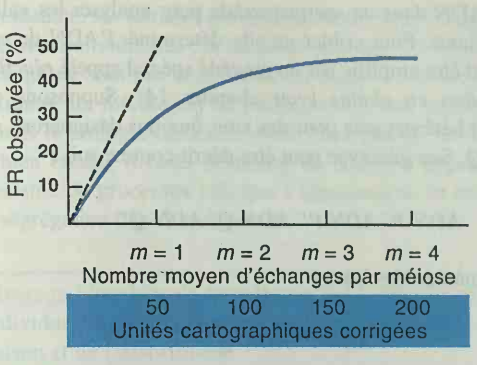


Figure 6-4. Représentation graphique de la fonction cartographique (ligne bleue). La ligne bleue et la ligne en traits interrompus coïncident pour de petites valeurs de *m*, là où la fonction est linéaire et où la FR est une estimation correcte de la distance cartographique.

moins est de 1 moins la fraction à zéro crossing-over. La fréquence de la classe à zéro crossing-over est

$$\frac{e^{-m}m^0}{0\,!}$$

ce qui équivaut à

$$e^{-m}.$$

de sorte que la fonction cartographique peut s'écrire

$$FR = \tfrac{1}{2}(1-e^{-m})$$

Cette formule relie la fréquence de recombinaison à *m*, le nombre moyen de crossing-over. Puisque le concept même de cartographie génétique repose sur la production de crossing-over et sur la proportionnalité entre la fréquence des crossing-over et la taille physique d'une région d'un chromosome, nous réalisons que *m* constitue probablement la variable la plus fondamentale de tout le processus. En fait, *m* est la véritable unité de distance cartographique.

Si nous disposons d'une valeur de FR, nous pouvons calculer *m* en résolvant l'équation ci-dessus. Quand nous portons la fonction en graphique, comme à la figure 6-4, plusieurs points intéressants apparaissent. D'abord, la fonction est linéaire dans le domaine correspondant à de très faibles valeurs de *m*. (Rappelons nous que *m* est la meilleure mesure de la distance génétique.) Par conséquent, FR est une bonne mesure de la distance lorsque la droite en traits interrompus coïncide avec la fonction comme sur la figure 6-4. Dans ce domaine, l'unité cartographique définie comme 1 pour cent de FR est significative. Utilisons dès lors cette région de la courbe pour définir les unités cartographiques vraies en prenant quelques valeurs basses de *m*.

Par exemple, pour $m = 0{,}05$, $e^{-m} = 0{,}95$ et

$$FR = \tfrac{1}{2}(1 - 0{,}95) = \tfrac{1}{2}(0{,}05) = \tfrac{1}{2} \times m\ ;$$

pour $m = 0{,}10$, $e^{-m} = 0{,}90$ et

$$FR = \tfrac{1}{2}(1 - 0{,}90) = \tfrac{1}{2}(0{,}10) = \tfrac{1}{2} \times m.$$

Nous voyons que $FR = \frac{m}{2}$ et cette relation définit la droite en traits interrompus dans le graphique 6-4. Elle nous permet de traduire les valeurs de *m* en unités cartographiques corrigées. Si nous exprimons *m* en pour cent, nous voyons qu'une valeur de *m* de 100 pour cent (= 1) équivaut à 50 unités cartographiques corrigées et nous pouvons porter ces unités en abscisse du graphique 6-4. Nous voyons ici que deux loci séparés par 150 unités cartographiques corrigées montrent une fréquence de recombinaison qui n'est que légèrement inférieure à 50 pour cent. Nous pouvons, grâce à cette courbe représentant la fonction, convertir la FR en distance cartographique par simple report, ce qui équivaut à une résolution graphique pour *m* de l'équation $FR = \frac{1}{2}(1-e^{-m})$.

Voici un exemple numérique d'utilisation de la fonction cartographique. Supposons que nous observions une FR de 27,5 pour cent. Combien d'unités cartographiques corrigées cela représente-t-il ?

$$0{,}275 = \tfrac{1}{2}(1 - e^{-m})$$

$$0{,}55 = 1 - e^{-m}$$

Donc

$$e^{-m} = 1 - 0{,}55 = 0{,}45$$

En consultant les tables de e^{-m},(ou en utilisant une calculette), nous trouvons une valeur de $m = 0{,}8$, ce qui correspond à 40 unités cartographiques corrigées. Si nous nous étions contentés d'accepter une FR de 27,5 pour cent comme représentant 27,5 u.c., nous aurions sous-estimé considérablement la distance réelle entre les loci.

Message L'estimation la plus précise de la distance génétique s'obtient en appliquant la fonction cartographique aux valeurs de FR. Une autre possibilité consiste à cartographier les gènes par sommation de petits intervalles génétiques au sein desquels la relation entre la FR et la distance génétique est linéaire.

Un corollaire de la deuxième partie de ce message est que pour des organismes chez lesquels les chromosomes sont déjà bien cartographiés, comme *Drosophila*, le généticien n'aura que peu recours à la fonction cartographique pour localiser de nouveaux gènes parce que la carte est déjà divisée en petites régions bien délimitées par les loci connus. Toutefois, quand la cartographie génétique d'un nouvel organisme en est à ses débuts ou quand les marqueurs génétiques sont chichement répartis sur les chromosomes, les corrections apportées par la fonction cartographique sont indispensables.

Remarquons que quelle que soit la distance séparant deux loci sur le chromosome, nous n'observons jamais de valeur de FR supérieure à 50 pour cent. Par conséquent, une valeur observée de RF de 50 pour cent ne nous permettrait pas de dire si deux loci sont liés ou s'il sont sur des chromosomes différents.

Autrement dit, quand *m* augmente, e^{-m} diminue et FR approche $\frac{1}{2}(1 - 0) = \frac{1}{2} \times 1 = 50$ pour cent. Cela peut vous paraître surprenant,mais des valeurs de FR de 100 pour cent ne pourront jamais être observées, si grande soit la distance séparant les loci !

L'analyse de méioses individuelles

Dans le chapitre 5, nous avons décrit brièvement un type d'organismes chez lesquels les produits des méioses individuelles restent groupés en paquets de quatre cellules. Ces paquets de cellules sont appelés des **tétrades** d'après le mot grec signifiant le nombre

quatre. L'analyse de tétrades n'est possible que chez certains champignons et algues unicellulaires. Chez les champignons basidiomycètes (ceux qui ressemblent aux champignons de Paris), une méiose produit quatre basidiospores. Ce sont les spores qui tombent du chapeau du champignon sur le sol. Chez les champignons ascomycètes tels que les levures et les moisissures, les produits de chaque méiose individuelle sont contenus dans un sac appelé **asque**. Ces spores sont appelées ascospores. L'algue unicellulaire *Chlamydomonas* possède également une structure de type asque. Les basidiospores, les ascospores et les spores équivalentes chez les algues sont des **spores sexuées**.

Les avantages des haploïdes pour l'analyse génétique

Les champignons et les algues unicellulaires sont des eucaryotes microbiens. Comme les procaryotes microbiens, les bactéries, ils peuvent être cultivés facilement et à peu de frais, ils sont petits et les analyses peuvent être effectuées sur des populations importantes. Ce sont là aussi des propriétés utiles en recherche. De plus, rappelez-vous que ces organismes sont haploïdes, ce qui constitue un double avantage pour l'analyse génétique. D'abord, comme ils n'ont qu'un jeu de chromosomes, il n'y a pas de complications liées aux relations de dominance/récessivité. Le phénotype est l'expression directe du génotype. Ensuite, en plus des avantages liés à l'analyse de tétrades, même l'analyse globale des produits de plusieurs méioses est plus facile qu'avec des diploïdes. En effet, dans le cycle vital haploïde, les deux cellules haploïdes parentales s'unissent pour former le méiocyte diploïde et la méiose de ce dernier est la seule dont le généticien ait à se soucier. Par contre, chez les organismes diploïdes, le généticien doit prendre en compte les méioses chez les deux parents.

Pour montrer à quel point l'étude de la liaison est facile chez les haploïdes, effectuons un croisement $a^+b^+ \times a\ b$ et analysons un échantillon aléatoire de produits méiotiques. Ceci ne présente pas de difficultés puisque chaque produit se développe directement en un individu haploïde. Nous pourrions obtenir les fréquences génotypiques suivantes dans la descendance :

a^+b^+	45 %
$a\ b$	45 %
$a\ b^+$	5 %
a^+b	5 %

Ce résultat permet de calculer facilement une FR de 10 %, donc d'établir que 10 unités cartographiques séparent les loci *a* et *b*.

Il est intéressant à ce stade de se rendre compte que l'analyse de produits haploïdes de méioses chez l'Homme est devenue possible grâce à la technologie moléculaire. Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'il est possible de détecter des sites variables neutres dans l'ADN au moyen de sondes moléculaires et que chez des individus «dihybrides», c'est à dire hétérozygotes pour deux sites de ce type, il est possible de mesurer la fréquence de recombinaison entre ces sites. Des échantillons de sperme peuvent être dilués jusqu'à ce qu'un tube à essai ne contienne plus qu'un seul spermatozoïde. Il y a assez d'ADN dans un spermatozoïde pour analyser les «allèles neutres variants. Pour cribler un site déterminé, l'ADN de ce sit doit d'abord être amplifié par un procédé spécial appelé *réaction d polymérisation en chaîne* (voir chapitre 14). Supposons qu'u homme soit hétérozygote pour des sites que nos désignerons *ADN P* et *ADN-Q*. Son génotype peut être décrit comme suit :

ADN-P' ADN-P" ADN-Q' ADN-Q"

et ses spermatozoïdes seront :

ADN-P' ADN-Q'

ADN-P' ADN-Q"

ADN-P" ADN-Q'

ADN-P" ADN-Q"

Leurs fréquences relatives montreront si les sites *P* et *Q* sont liés ou non. Donc, pour certains sites, les humains peuvent être analysés aussi facilement que les organismes haploïdes.

Qu'apporte l'analyse de méioses individuelles à la génétique ?

Vous pourriez vous demander pourquoi l'analyse de méioses individuelles est tellement importante ; après tout, nous venons d'établir quelques unes des règles de base de l'analyse génétique et nous ne les avons même pas encore utilisées. Une première réponse à cette question est que l'étude de méioses individuelles permet au généticien d'observer *directement* le comportement des gènes à la méiose, sans avoir recours à des inférences. Prenons l'exemple de l'inférence que nous faisons quand nous étudions la ségrégation des allèles dans un hétérozygote *Aa*. Lorsque nous observons un nombre égal d'allèles *A* et *a* dans un échantillon de gamètes pris au hasard, nous attribuons cela à la ségrégation de ces allèles dans les méioses individuelles. L'analyse de tétrades confirme directement que cela se passe effectivement ainsi. Cette observation directe est capitale pour la recherche en génétique. De plus, les tétrades permettent d'étudier plusieurs phénomènes qui ne sont pas accessibles à l'analyse conventionnelle. Nous avons déjà rencontré une étude de ce typedans le chapitre 5 : la détermination du nombre de chromatides qui peuvent être impliqués dans les crossing-over. Une autre analyse qui n'est pas possible sur la base de l'étude globales de produits de méioses est la cartographie des centromères par rapport à d'autres loci ; cette méthode fondamentale de cartographie a finalement abouti à la construction de chromosomes artificiels de levure. Enfin, l'observation de profils de ségrégation particuliers lors de l'analyse de tétrades a conduit à l'élaboration d'un des principaux modèles moléculaires pour expliquer le crossing-over : le modèle qui fait intervenir de l'ADN hétéroduplex (ou hybride), que nous discuterons en détail dans le chapitre 20.

Mais les chromosomes des champignons et des algues unicellulaires sont-ils représentatifs des chromosomes eucaryotiques ? La réponse est, en général, oui, de sorte que les découvertes faites sur ces systèmes modèles peuvent dans bien des cas être extrapolées aux plantes et aux animaux.

En résumé, les tétrades permettent d'effectuer l'analyse directe de méioses individuelles ; la méthode peut servir à étudier des processus qui ne sont pas accessibles à l'analyse globale de produits méiotiques. La méiose est un phénomène d'une importance capitale dans la biologie des eucaryotes. Bien que ce phénomène soit déjà bien étudié, il reste beaucoup de choses à apprendre sur le mécanisme de processus tels que l'appariement, le crossing-over et la ségrégation des chromosomes.

Message L'analyse de tétrades permet l'examen de méioses individuelles, ce qui est précieux pour l'étude de la recombinaison et de l'assortiment.

Chez certains eucaryotes où des tétrades peuvent être isolées et analysées, les quatre produits de la méiose se développent directement en quatre spores sexuées (voir figure 6-5).

Chez certains ascomycètes, chacune des quatre cellules issues de la méiose subit une division mitotique supplémentaire, produisant un groupe de huit cellules appelé octade. Une octade est simplement une double tétrade composée de quatre paires de spores. Les spores d'une paire sont identiques puisqu'elles sont les cellules filles issues par mitose d'un des quatre produits de la méiose.

Les spores sexuées, qu'elles soient quatre ou huit, peuvent être disposées de deux manières différents. Chez certaines espèces, les spores se présentent sans ordre particulier. Ce type d'arrangement

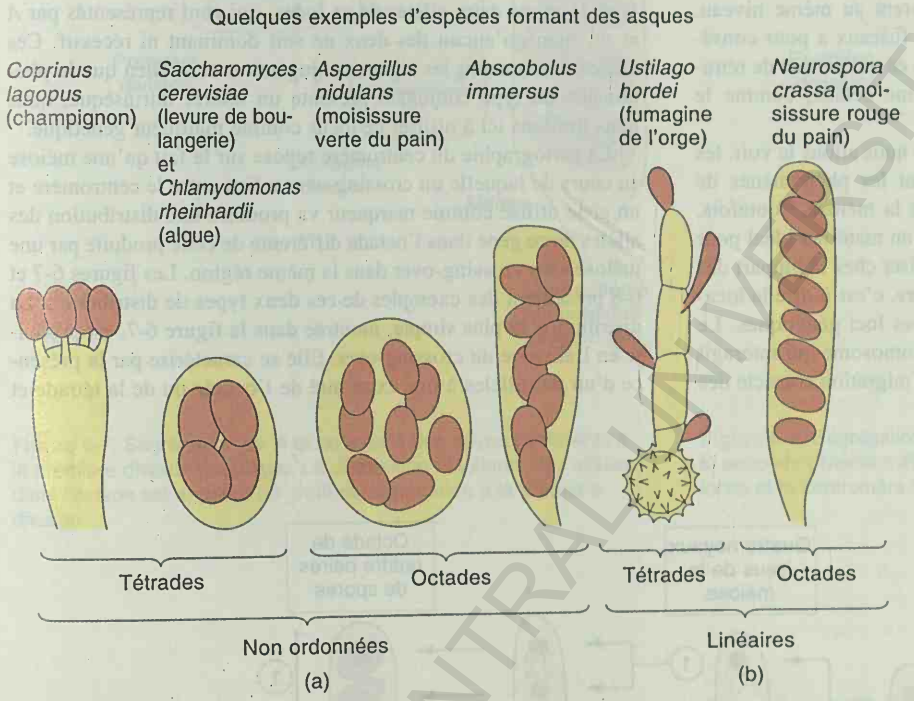
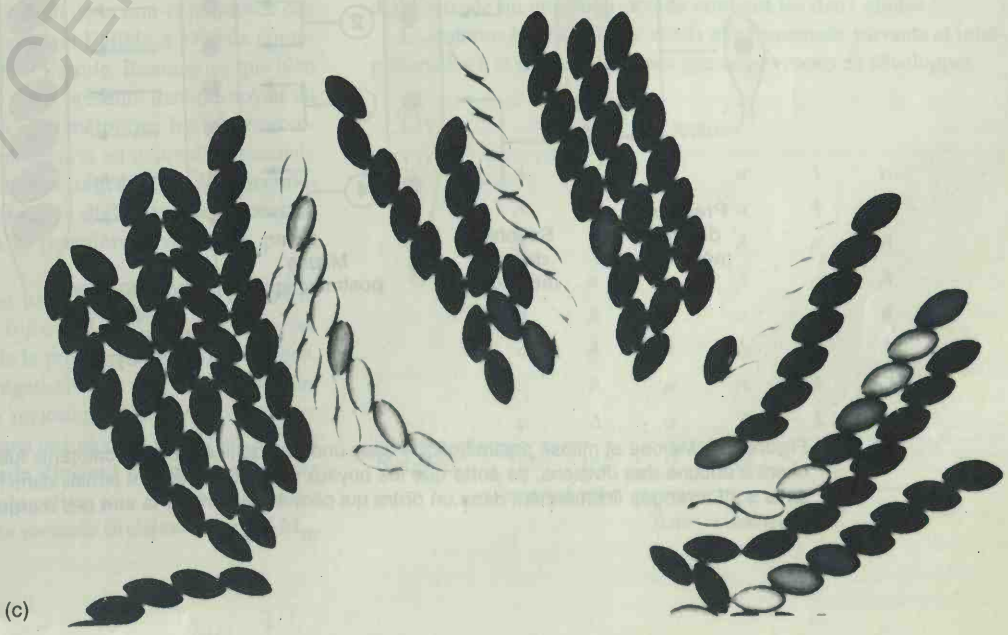


Figure 6-5. Divers types de tétrades et d'octades rencontrées chez différents organismes. (a) Non ordonnées. (b) Linéaires. (c) Asques de *Neurospora crassa* en cours de maturation. (Namboori B. Raju, *European Journal of Cell Biology*, 1980.)



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(ou plutôt d'absence d'arrangement), appelé **tétrade non ordonnée**, est décrit dans la figure 6-5(a). Chez d'autres espèces, les spores sont remarquablement alignées en **tétrades linéaires**, comme dans la figure 6-5(b). Tétrades non ordonnées et linéaires trouvent chacune leurs applications spécifiques en analyse génétique. Nous traiterons d'abord des types linéaires.

Analyse de tétrades linéaires

Comment les tétrades linéaires sont-elles produites ? Le facteur déterminant est la position différente des fuseaux des deux divisions méiotiques et de ceux de la mitose post-méiotique. L'origine probable de ce positionnement différent est que ces divisions ont lieu dans une structure tubulaire qui impose des contraintes physiques empêchant que les fuseaux s'élaborent au même niveau. Quoi qu'il en soit, la non-coïncidence des fuseaux a pour conséquence un arrangement linéaire des noyaux, ce qui permet de retracer le lignage de chacun des noyaux d'une octade, comme le montre la figure 6-6.

Comme vous vous y attendiez et comme nous allons le voir, les tétrades linéaires illustrent magnifiquement les phénomènes de ségrégation et d'assortiment indépendant à la méiose. Toutefois, les tétrades linéaires constituent également un matériau idéal pour un type spécial d'analyse, impossible à réaliser chez la plupart des organismes : **la cartographie du centromère**, c'est-à-dire la localisation du centromère par rapport à d'autres loci génétiques. Le centromère est une région fascinante du chromosome qui interagit avec les fibres du fuseau et assure ainsi une migration correcte des chromosomes lors de la division nucléaire. Quand ce processus fonctionne mal, les cellules filles ont des nombres anormaux de chromosomes, ce qui peut causer leur mort ou des anomalies phénotypiques. Par exemple, des nombres anormaux de chromosomes sont à l'origine d'une classe très importante de maladies génétiques chez l'être humain, dont nous parlerons au chapitre 9.

Comment procède-t-on à la cartographie du centromère ? Prenons comme exemple le champignon *Neurospora crassa* qui appartient à la classe des ascomycètes. *Neurospora* produit des octades linéaires. Sous sa forme la plus simple, la cartographie du centromère consiste à se demander à quelle distance un gène donné se trouve du centromère de son chromosome. Nous pourrions choisir n'importe quel locus de *Neurospora* pour illustrer cette technique, mais nous utiliserons le locus du **signe conjugant** parce qu'il fut l'un des premiers à être utilisé dans ce type d'analyse. Il existe deux allèles de ce locus, qui sont représentés par *A* et *a* , bien qu'aucun des deux ne soit dominant ni récessif. Ces allèles déterminent les signes conjugants *A* et *a*. Bien que le phénomène du type conjugant présente un intérêt intrinsèque, nous nous limitons ici à utiliser ce locus comme marqueur génétique.

La cartographie du centromère repose sur le fait qu'une méiose au cours de laquelle un crossing-over a lieu entre le centromère et un gène utilisé comme marqueur va produire une distribution des allèles de ce gène dans l'octade différente de celle produite par une méiose sans crossing-over dans la même région. Les figures 6-7 et 6-8 présentent des exemples de ces deux types de distribution. La distribution la plus simple, montrée dans la figure 6-7, est produite en l'absence de crossing-over. Elle se caractérise par la présence d'un des allèles à une extrémité de l'octade ou de la tétrade et

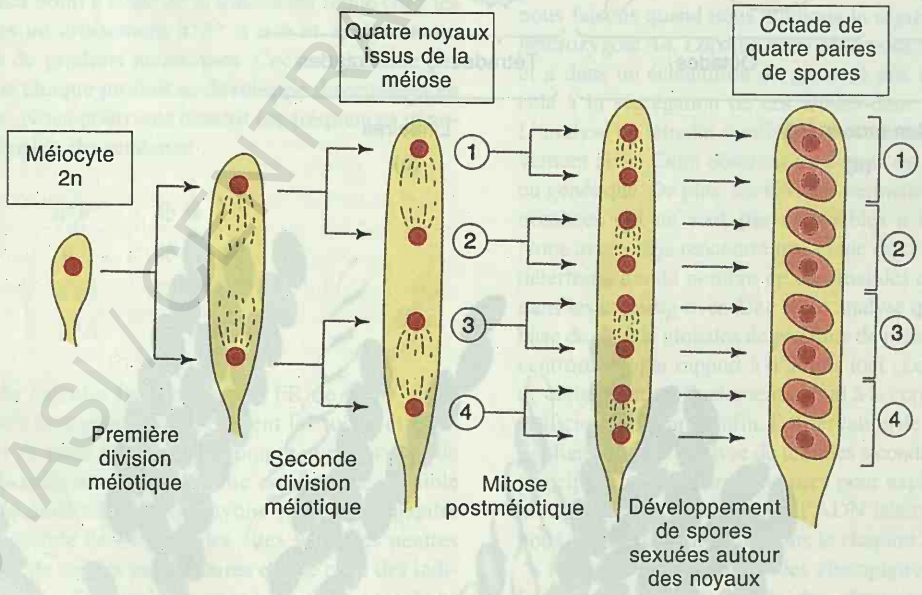


Figure 6-6. Méiose et mitose postméiotique dans une tétrade linéaire. Les différents fuseaux nucléaires ne se chevauchent à aucune des divisions, de sorte que les noyaux ne s'intervertissent jamais dans l'asque. Les huit noyaux résultants sont arrangés linéairement dans un ordre qui permet de retracer le sort des marqueurs au cours des divisions successives.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

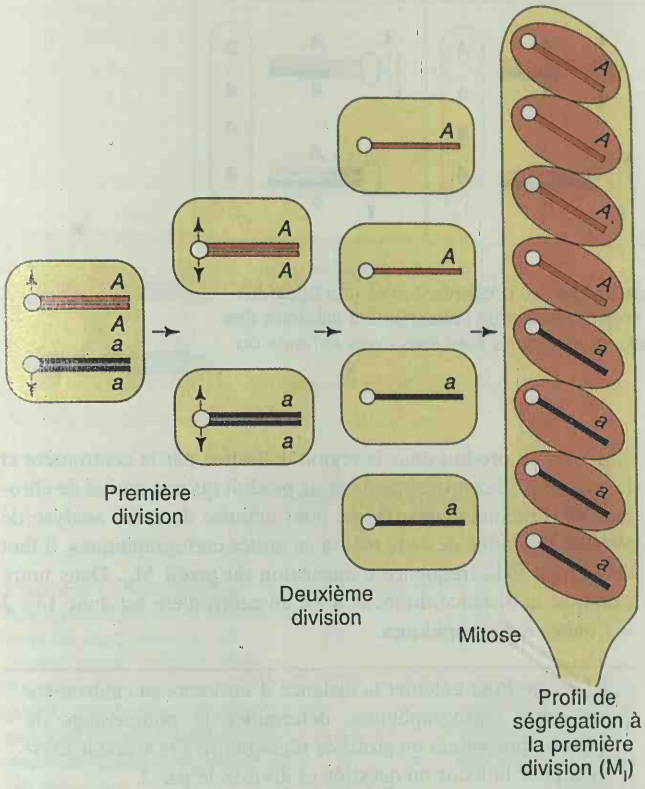


Figure 6-7. Ségrégation de *A* et de *a* dans des noyaux différents à la première division méiotique. La distribution résultante des allèles dans l'octade est appelée un profil de ségrégation à la première division.

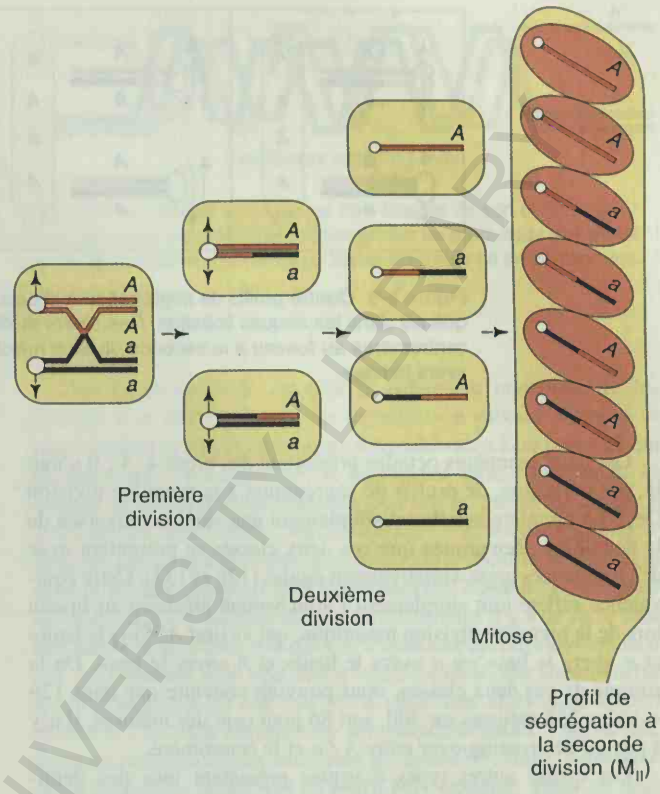


Figure 6-8. Ségrégation de *A* et de *a* dans des noyaux différents à la seconde division méiotique, à la suite d'un crossing-over entre le locus et le centromère.

de l'autre allèle à l'autre extrémité. Le diagramme explique comment se produit cette répartition : du fait de la non-coïncidence des fuseaux successifs, les noyaux contenant l'allèle *A* et ceux contenant *a* ne sont jamais intervertis dans l'asque. Remarquez que bien que les allèles *A* et *a* soient tous deux présents dans le noyau du méiocyte diploïde, la première division méiotique les sépare complètement, et que ces allèles restent séparés au cours de la seconde division méiotique. On parle dès lors de **ségrégation à la première division** et dans ce cas, la position des allèles dans les spores est appelée **profil de ségrégation à la première division** ou **profil M_I**.

Quand un crossing-over a lieu dans la région entre le centromère et le marqueur (voir figure 6-8), *A* et *a* se trouveront encore ensemble dans les noyaux issus de la première division méiotique. Il n'y a donc pas eu de ségrégation à la première division. Toutefois, à la seconde division méiotique, les allèles *A* et *a* se trouvent effectivement séparés dans des noyaux différents, et l'on parle de **ségrégation à la seconde division**. La distribution des allèles dans la tétrade ou l'octade reflète ces événements et est appelée **profil de ségrégation à la seconde division** ou **profil M_{II}**.

Ce profil est reflété par toutes les distributions dans lesquelles une demi-tétrade ou une demi-octade contient les deux allèles.

Examinons à présent les résultats expérimentaux suivants et interprétons-les à la lumière des idées que nous venons de développer.

	Octades					
	A	*a*	*A*	*a*	*A*	*a*
	A	*a*	*A*	*a*	*A*	*a*
	A	*a*	*a*	*A*	*a*	*A*
	A	*a*	*a*	*A*	*a*	*A*
	a	*A*	*A*	*a*	*a*	*A*
	a	*A*	*A*	*a*	*a*	*A*
	a	*A*	*a*	*A*	*A*	*a*
	a	*A*	*a*	*A*	*A*	*a*
Nombre	126	132	9	11	10	12
	Total = 300					

BOHANAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

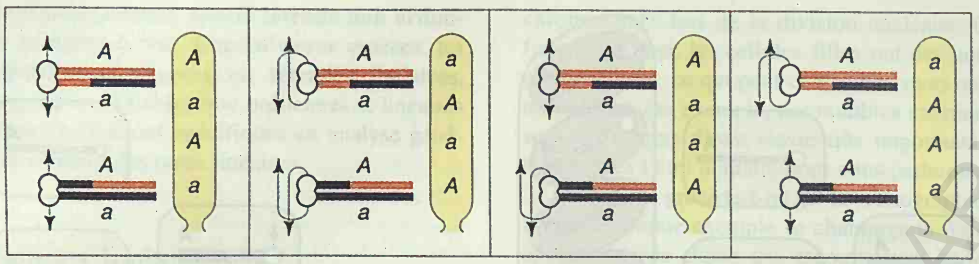


Figure 6-9. Quatre profils de ségrégation à la seconde division se présentent avec une égale fréquence dans les asques linéaires. Ces divers profils sont le résultat de l'attachement aléatoire des centromères au fuseau à la seconde division méiotique, qui fait qu'ils sont tirés «vers le haut» ou «vers le bas».

Les deux premières octades présentent des blocs 4 : 4 ; il s'agit là, par définition, de profils de ségrégation à la première division (M_I). La première octade est simplement une version renversée de la deuxième. Remarquez que ces deux classes se présentent avec des fréquences approximativement égales (126 et 132). Cette équivalence reflète tout simplement l'attachement aléatoire au fuseau lors de la première division méiotique, qui va tirer *A* «vers le haut» et *a* «vers le bas» ou *a* «vers le haut» et *A* «vers le bas». De la somme de ces deux classes, nous pouvons conclure que dans 126 + 132 = 258 méioses sur 300, soit 86 pour cent des méioses, il n'y a pas eu de crossing-over entre *A* / *a* et le centromère.

Les quatre autres types d'asques présentent tous des demi-asques contenant à la fois *A* et *a*, ce qui montre que *A* et *a* ont ségrégé non à la première, mais à la seconde division méiotique. Quelle est l'origine de ces quatre variations sur le thème du profil M_{II} ? Encore une fois, il s'agit de l'attachement aléatoire au fuseau qui peut se manifester non seulement à la première, mais aussi à la seconde division méiotique. Cet attachement aléatoire au fuseau et ses conséquences sont représentés dans la figure 6-9. Les schémas M_{II} (ségrégations de seconde division) sont au nombre de 9 + 11 + 10 + 12 = 42 sur 300, soit 14 pour cent, ce qui signifie qu'un crossing-over a eu lieu entre *A* / *a* et le centromère dans 14 pour cent des méioses.

Voilà ! Nous avons établi que le profil M_{II} se produit avec une fréquence de 14 pour cent. Cela signifie-t-il que le locus *A* / *a* est à 14 u.c. du centromère ? La réponse est non, mais cette valeur peut être utilisée pour calculer la distance en unités cartographiques. Les 14 pour cent représentent un nombre de méioses et ce n'est pas la façon dont nous avons défini les unités cartographiques. Les unités cartographiques sont définies en termes de pourcentage de chromosomes recombinants issus des méioses. La figure 6-10 montre qu'une méiose au cours de laquelle un crossing-over se produit dans la région délimitée par le centromère et le locus utilisé comme marqueur ne produit qu'une moitié de chromosomes recombinants. Donc, pour déduire de notre analyse de tétrades l'étendue de cette région en unités cartographiques, il faut diviser par 2 la fréquence d'apparition du profil M_{II}. Dans notre exemple, la distance du locus *A* / *a* au centromère est donc 14 : 2 = 7 unités cartographiques.

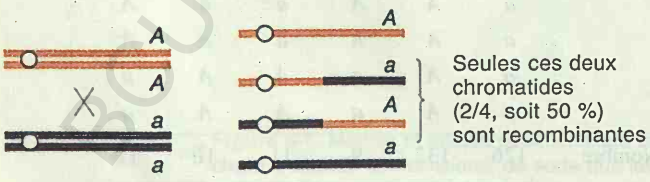


Figure 6-10. Une moitié seulement des chromatides provenant d'une méiose accompagnée d'un seul crossing-over sont des chromatides recombinantes.

Message Pour calculer la distance d'un locus au centromère en unités cartographiques, déterminez le pourcentage de tétrades présentant un profil de ségrégation à la seconde division pour le locus en question et divisez-le par 2.

Ce type d'analyse peut être élargi et appliqué à la ségrégation d'un nombre quelconque de paires de gènes hétérozygotes lors d'un croisement. Prenons comme exemple le cas de deux paires de gènes. Supposons que nous ne connaissions pas la nature de la liaison entre les marqueurs *a* et *b* ni entre ces marqueurs et leur centromère ou leurs centromères respectifs. Le nombre de possibilités est restreint :

1. Les loci sont sur des chromosomes distincts.
2. Les loci sont de part et d'autre du centromère sur le même chromosome.
3. Les loci sont du même côté par rapport au centromère (donc sur le même chromosome).

Les deux premières situations devraient donner lieu à des schémas M_{II} indépendants pour les deux loci. La troisième possibilité est plus intéressante en ce sens qu'un crossing-over dans la région entre le centromère et le locus qui en est le plus proche (proximal) devrait produire un profil M_{II} dans le même asque pour les deux loci (sauf dans les rares cas de doubles crossing-over). D'où, si *a* est proximal par rapport à *b*, par exemple, nous devrions nous attendre à ce que la plupart des asques présentant un profil M_{II} pour *a* en présentent également un pour *b* (figure 6-11). Cette relation d'interdépendance de schémas M_{II} peut fournir des indications sur la liaison entre marqueurs non cartographiés ; elle est fréquemment découverte lors d'expériences de routine de cartographie du centromère.

Message Des gènes situés sur un même bras de chromosome présentent fréquemment des profils de ségrégation de seconde division parallèles.

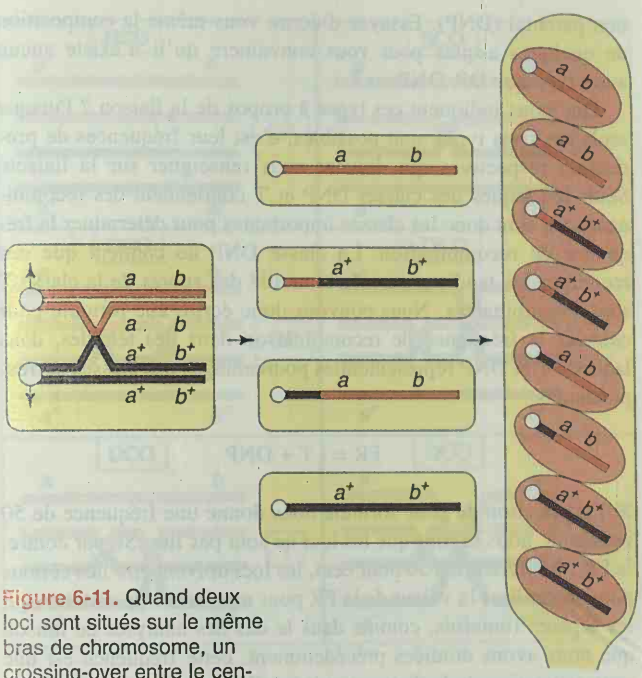


Figure 6-11. Quand deux loci sont situés sur le même bras de chromosome, un crossing-over entre le centromère et le locus qui en est le plus proche produira un profil de ségrégation à la seconde division (M_{II}) pour les deux loci.

Profil de ségrégation à la seconde division (MII) pour les marqueurs aux loci *a* et *b*

La fréquence des profils M_{II} sera évidemment d'autant plus grande qu'un locus est éloigné du centromère. Elle n'atteint toutefois jamais 100 pour cent ; en fait, le maximum théorique est de 67 pour cent, soit 2/3. La raison en est que les crossing-over multiples (particulièrement les doubles) deviennent prépondérants lorsque l'intervalle s'accroît, et que les doubles crossing-over peuvent aussi bien produire des schémas M_I que des M_{II}. Par exemple :

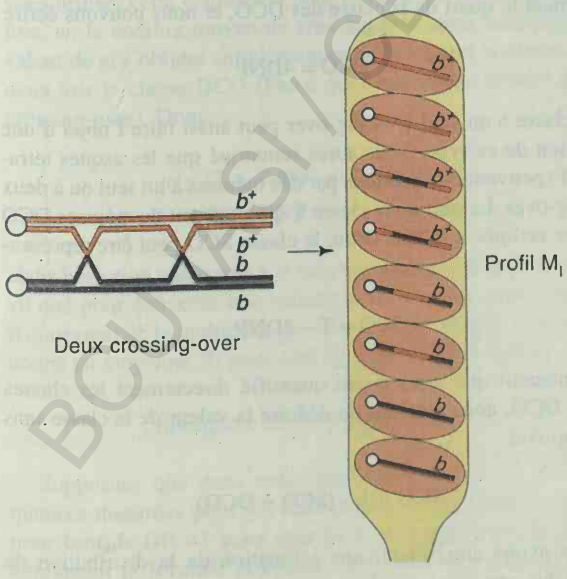


Figure 6-12. Quand un locus est très éloigné de son centromère, nous pouvons imaginer des crossing-over se produisant entre eux en nombre si élevé que le locus ne semble plus lié au centromère.

Une façon aisée de calculer la fréquence maximale de M_{II} consiste à se livrer à l'exercice de réflexion suivant. Prenons un locus hétérozygote b^+ / b éloigné du centromère à un point tel que de nombreux crossing-over se produisent dans l'intervalle. Le résultat de ces nombreux crossing-over est de découpler de fait le locus de son centromère ; les deux allèles *b* et les deux allèles b^+ peuvent par conséquent être distribués de n'importe quelle façon dans la tétrade (figure 6-12). Nous pouvons simuler ce phénomène en examinant combien de façons différentes il y a de faire tomber quatre billes (deux *b* et deux b^+) dans une éprouvette (figure 6-13). La première bille peut être b^+ ou *b* ; cela ne fait aucune différence. Supposons qu'elle soit b^+. Il nous reste alors deux billes *b* et une b^+. La bille suivante va déterminer le profil : M_I ou M_{II}. Dans un tiers des cas, la deuxième bille sera b^+ ; donc, les troisième et quatrième seront *b* et un profil M_I s'ensuivra. Dans les deux tiers des cas restants, la seconde bille sera *b*, ce qui va produire un profil M_{II}. Nous voyons ainsi que lorsque le nombre de crossing-over est très élevé (disons infini), la fréquence des profils M_{II} ne peut jamais dépasser 2/3.

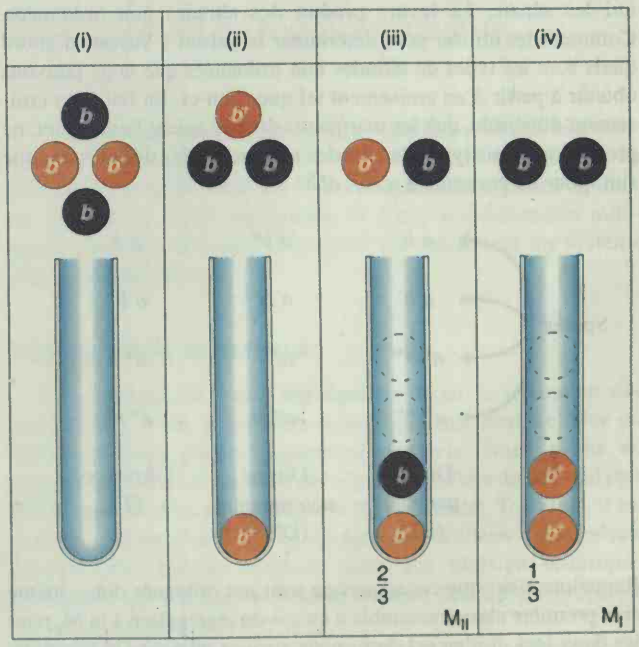


Figure 6-13. Etablissement des fréquences limites d'apparition des profils de ségrégation M_I et M_{II} (1/3 et 2/3 respectivement) dans l'analyse de tétrades linéaires. (Reportez-vous au texte pour les détails.)

BCU LAUSANNE / GENERAL UNIVERSITY LIBRARY

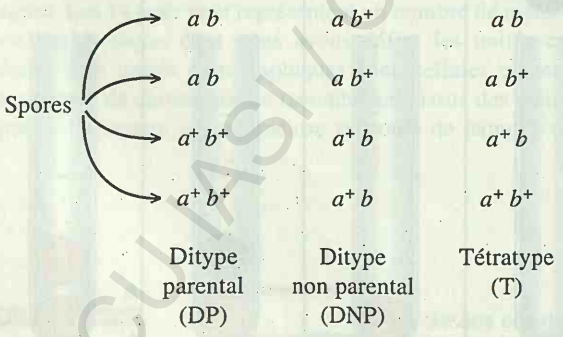
Message La fréquence maximale que puissent atteindre les profils de ségrégation à la seconde division est de 66,7 pour cent (2/3).

Cette valeur maximale pose une énigme. Nous percevons intuitivement que le maximum des M_{II} devrait être l'équivalent du maximum de 50 pour cent de recombinaison observé dans le cas de grandes distances cartographiques. Or ici, 66,7 : 2 = 33,3 pour cent, ce qui correspond à 33,3 unités cartographiques (u.c.). Les trouble-fête sont, une fois de plus, les crossing-over multiples. Nous pourrions établir une fonction cartographique pour les schémas M_{II}, mais pratiquement il est plus facile de s'en tenir à des analyses portant sur des intervalles plus courts et d'admettre que les fréquences croissantes de M_{II} vont fournir des estimations de moins en moins exactes de la distance du marqueur au centromère.

Analyse de tétrades non ordonnées

Dans les tétrades ou octades non ordonnées, il n'y a pas d'arrangement particulier des spores, de sorte que des analyses basées sur la cartographie du centromère comme celles que nous venons de présenter ne sont pas possibles. Cependant, l'analyse de tétrades non ordonnées trouve un domaine d'application tout à fait général dans l'étude de nombreux aspects de la ségrégation et de la recombinaison méiotiques. Certaines de ces applications seront présentées dans des problèmes à la fin du chapitre. L'exemple présenté ici montre comment l'analyse de tétrades non ordonnées peut se substituer à l'utilisation de la fonction cartographique pour prendre en compte les doubles crossing-over. En particulier, nous verrons comment l'estimation directe fournie par les tétrades permet d'éviter certaines des suppositions inhérentes à la méthode mathématique.

Nous étudions deux loci de la levure, *a* et *b* pour déterminer s'ils sont liés et si c'est le cas, pour calculer la distance corrigée qui les sépare. La levure produit des tétrades non ordonnées. Comment les utiliser pour déterminer la liaison ? Voyons d'abord quels sont les types de tétrades non ordonnées que nous pouvons obtenir à partir d'un croisement tel que celui-ci. En fait, *tout* croisement dihybride, que les marqueurs étudiés soient liés ou non, ne produit que trois types de tétrades non ordonnées définies comme suit, pour un croisement $a\ b \times a^+b^+$:



Rappelons-nous que ces asques ne sont pas ordonnés donc, même si la première classe ressemble à un cas de ségrégation à la M_I pour les deux loci, il n'en est rien : nous aurions pu écrire le génotype des spores dans n'importe quel ordre. Ces asques ont simplement été classés selon le nombre de génotypes qu'ils contiennent : deux (*di*types) ou quatre (*tétra*types, représentés par T). Parmi les ditypes, les deux génotypes peuvent être de type parental (DP) ou non parental (DNP). Essayez d'écrire vous-même la composition de quelques asques pour vous convaincre qu'il n'existe aucun autre type que DP, DNP ou T.

Que nous indiquent ces types à propos de la liaison ? Puisque seuls ces trois types sont possibles, c'est leur fréquences de production respectives qui doivent nous renseigner sur la liaison. Seuls les asques des classes DNP et T contiennent des recombinants. Ce sont donc les classes importantes pour déterminer la fréquence de recombinaison. La classe DNP ne contient que des recombinants tandis que seule la moitié des spores de la classe T sont recombinantes. Nous pouvons donc écrire une formule pour calculer la fréquence de recombinaison dans des tétrades, dans laquelle T et DNP représententles pourcentages des classes correspondantes :

$$FR = \tfrac{1}{2}T + DNP$$

Si l'application de cette formule nous donne une fréquence de 50 pour cent, nous savons que les loci ne sont pas liés. Si, par contre, la FR est inférieure à 50 pour cent, les loci doivent être liés et nous pouvons utiliser la valeur de la FR pour représenter la distance qui les sépare. Toutefois, comme dans le cas des analyses de liaison que nous avons étudiées précédemment, cette fréquence est une sous-estimation de la distance puisqu'elle ne tient pas compte des crossing-over multiples. Mais d'autres calculs basés sur les fréquences des classes observées dans les tétrades non ordonnées peuvent nous fournir une valeur corrigée pour les doubles crossing-over. Il nous faut donc d'abord établir la relation entre les classes DP, DNP et T dans le cas de loci liés. Supposons que *a* et *b* soient liés. Si nous supposons que parmi les méioses individuelles, certaines se feront sans crossing-over (NCO), avec un seul crossing-over (SCO) ou un double crossing-over (DCO) dans la région comprise entre *a* et *b*, nous pouvons alors représenter les classes d'asques non ordonnés issus de ces méioses comme sur la figure 6-14. Remarquez en passant que la figure 6-14 n'est qu'une représentation plus développée de la figure 6-3.

La clé de l'analyse est la classe des DNP qui, dans le cas de deux marqueurs liés, ne peuvent apparaître qu'à la suite d'un double crossing-over impliquant les quatre chromatides. Puisque nous supposons que les doubles crossing-over se produisent de façon aléatoire entre chromatides, la classe des DNP devrait être exactement le quart de la classe des DCO, et nous pouvons écrire

$$DCO = 4DNP$$

La classe à un seul crossing-over peut aussi faire l'objet d'une estimation de ce type. Vous aurez remarqué que les asques tétratypes (T) peuvent être produits par des méioses à un seul ou à deux crossing-over. La part de la classe T qui provient de méioses DCO peut être estimée à 2DNP. D'où, la classe SCO peut être représentée par

$$SCO = T - 2DNP$$

Maintenant que nous avons quantifié directement les classes SCO et DCO, nous pouvons en déduire la valeur de la classe sans crossing-over

$$NCO = 1 - (SCO + DCO)$$

Nous avons ainsi établi une estimation de la distribution de Poisson des crossing-over dans une région déterminée. Nous pou-

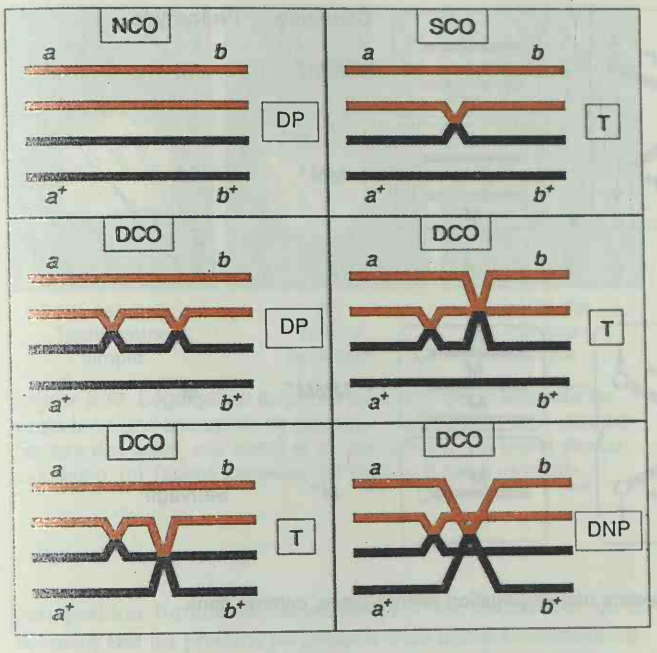


Figure 6-14. Les différentes façons de produire les classes de tétrades tétratype (T), ditype parental (DP) et ditype non parental (DNP) dans l'analyse de gènes liés. (NCO = méioses sans crossing-over ; SCO = méioses à un seul crossing-over ; DCO = méioses à double crossing-over.)

vons utiliser cette estimation pour calculer, de façon directe cette fois, m, le nombre moyen de crossing-over dans cette région. La valeur de m s'obtient simplement en additionnant la classe SCO et *deux fois* la classe DCO (Parce que cette classe résulte de deux crossing-over). Donc

$$m = (T - 2DNP) + 2\,(4DNP)$$
$$= T + 6DNP$$

Dans la section consacrée à la fonction cartographique, nous avons vu que pour convertir une valeur de m en unités cartographiques, il convenait de la multiplier par 50 parce que chaque crossing-over donne en moyenne 50 pour cent de recombinants. Donc

$$\text{distance} = 50\,(T + 6DNP)\ \text{u.c.}$$

Supposons que dans notre croisement $a\ b \times a^+\ b^+$, les fréquences mesurées pour les différentes classes d'asques soient 56 pour cent de DP, 41 pour cent de T et 3 pour cent de DNP. En appliquant la formule ci-dessus, nous trouvons pour la distance entre a et b

$$50\,[0{,}41 + (6 \times 0{,}03)] = 50\,(0{,}59)$$
$$= 29{,}5\ \text{u.c.}$$

Nous pouvons comparer la précision de cette méthode avec celle d'une simple mesure par analyse de fréquence de recombinaison (FR). Rappelons que la formule de la FR est

$$RF = \tfrac{1}{2}\,T + DNP$$

Dans notre exemple,

$$RF = 0{,}205 + 0{,}03$$
$$= 0{,}235, \text{ soit } 23{,}5\ \text{u.c.}$$

Cette valeur de la distance est inférieure de 6 u.c. à celle que nous avons obtenue en utilisant notre formule basée sur l'analyse de tétrades parce que dans la cartographie par FR, nous n'avons pas pu introduire de correction pour les doubles crossing-over.

A quelles valeurs de DP, DNP et T faut-il s'attendre dans le cas de gènes non liés ? Les classes DP et DNP auront la même taille à cause de l'assortiment indépendant. La classe T résultera uniquement de crossing-over entre chacun des gènes et son centromère et la taille de cette classe dépendra donc de la somme des tailles de ces deux régions.

La formule établie pour des tétrades non ordonnées peut bien entendu être appliquée à l'analyse de tétrades linéaires.

Message L'analyse de tétrades non ordonnées peut être utilisée dans de nombreux contextes en génétique méiotique, entre autres pour mesurer la distribution des fréquences des crossing-over simples et doubles afin de calculer des distances cartographiques précises.

Ségrégation et recombinaison mitotiques

Nous pensons habituellement à la ségrégation et à la recombinaison comme à des phénomènes typiquement méiotiques, mais ils peuvent se produire (bien que moins fréquemment) durant la mitose. L'existence d'une ségrégation et d'une recombinaison mitotiques peut être aisément démontrée en choisissant un système génétique approprié.

Ségrégation mitotique

En génétique, le terme **ségrégation** décrit la séparation des deux allèles d'une paire hétérozygotique dans deux cellules ou deux individus phénotypiquement distincts. Nous avons eu maintes occasions d'observer des ségrégations lors de nos analyses méiotiques fondées sur la première loi de Mendel. Toutefois, il est parfois possible d'observer la ségrégation des allèles d'une cellule hétérozygote lorsque celle-ci subit une division *mitotique*. L'exemple qui suit met en lumière la façon dont cette ségrégation mitotique est décelée.

Dans les années trente, Calvin Bridges étudiait des femelles de *Drosophila* de génotype M/M^+ (M est un allèle dominant qui détermine un phénotype caractérisé par des soies fines). Certaines femelles présentaient une tache ou **secteur** de soies de type sauvage sur un corps de phénotype M. Donc, une ségrégation des allèles

BOUAZIZ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

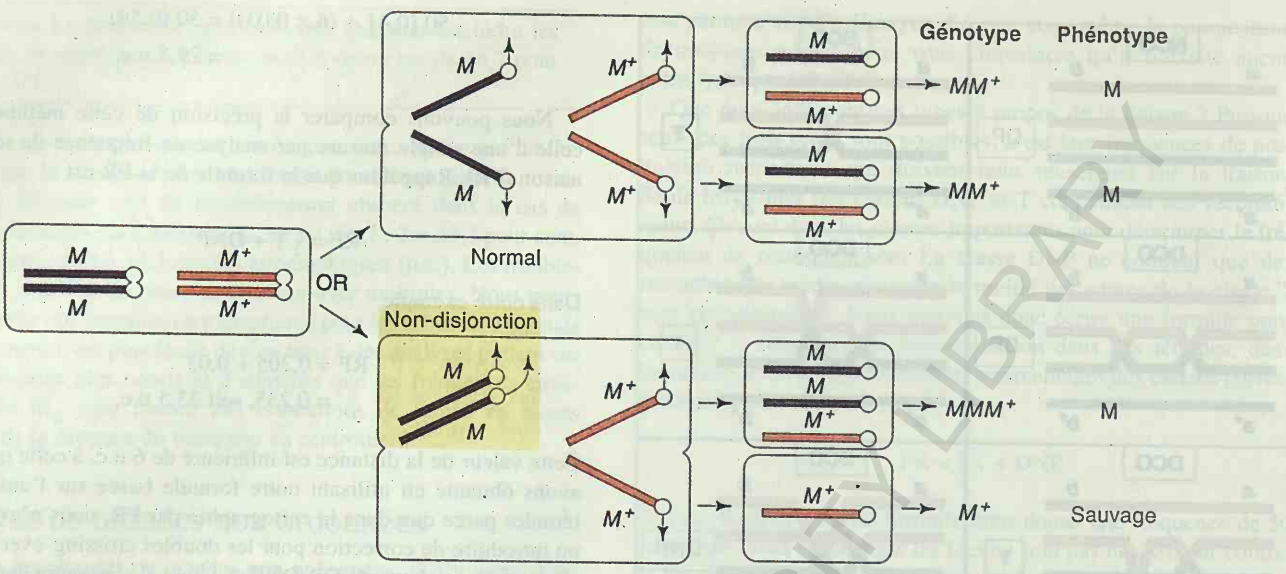


Figure 6-15. La non-disjonction mitotique peut avoir pour conséquence une ségrégation phénotypique, comme dans l'exemple de *M* et *M+* montré ici.

hétérozygotes se manifestait au niveau du phénotype. Bridges conclut que cette ségrégation était le résultat d'une **non-disjonction mitotique** (figure 6-15). Chez des hétérozygotes portant les allèles sauvage et autosomique récessif du gène (a^+/a), on pouvait également observer des secteurs montrant le phénotype récessif sur fond de phénotype sauvage. La présence de ces secteurs s'explique aussi par une non-disjonction mitotique.

D'autres cas de ségrégation dans les tissus somatiques d'un hétérozygote sont attribuables à la **perte d'un chromosome à la mitose**. Dans ce cas, le chromosome porteur d'un allèle dominant est en quelque sorte oublié lorsque les noyaux fils se reconstituent après la mitose (figure 6-16).

Les généticiens ont recours à deux termes qu'ils trouvent utiles dans la description de ces phénomènes. Tout d'abord, la **panachure** qui définit simplement l'existence de secteurs d'aspect différent dans un tissu somatique, quelle qu'en soit la cause. Ensuite, la **mosaïque**, qui est un individu constitué de tissus de deux génotypes différents ou davantage, souvent reconnaissables par leurs phénotypes particuliers.

Crossing-over mitotique

En 1936, Curt Stern montra que les secteurs d'une mosaïque ne résultent pas toujours d'une non-disjonction ou de la perte d'un chromosome à la mitose. Au cours d'expériences sur les gènes liés au sexe *y* («yellow», jaune) et *sn* («singed», qui détermine des soies courtes et recroquevillées, comme roussies par le feu) chez *Drosophila*, Stern fit un croisement y^+sn / $y^+sn \times y\ sn^+$ / Y. Les femelles issues du croisement étaient en majorité d'apparence sauvage, comme on s'y attendait sur la base de leur génotype $y^+\ sn/y\ sn^+$. Certaines, toutefois, présentaient des secteurs de tissu jaune ou «singed» ; l'apparition de ces secteurs pouvait s'expliquer par la non-disjonction ou la perte d'un chromosome. Toutefois, certaines femelles présentaient des **taches jumelées**. Une paire de taches jumelées, dans le cas qui nous occupe, est constituée de deux secteurs adjacents, l'un de tissu jaune, l'autre de tissu «singed», sur un fond de tissu de type sauvage (figure 6-17). Stern remarqua que les secteurs des taches jumelées étaient toujours adjacents et apparaissaient trop fréquemment pour résulter de la

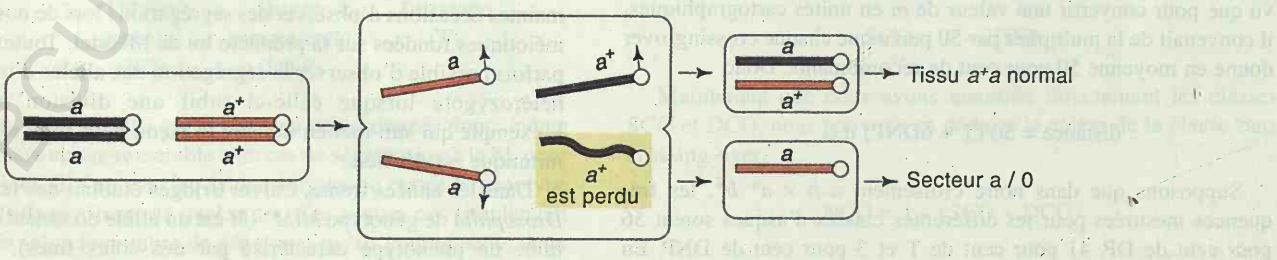
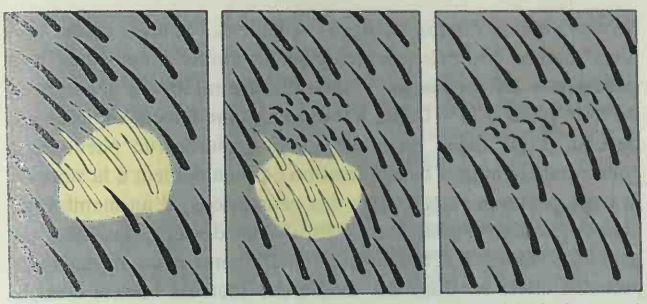


Figure 6-16. La perte d'un chromosome lors de la division mitotique peut entraîner une ségrégation phénotypique.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



(a) Tache jaune simple — (b) Taches jumelées — (c) Tache «singed» simple

Figure 6-17. Ségrégation de phénotypes de l'aspect extérieur du corps chez une drosophile de génotype y^+ *sn* / *y* sn^+ ; *sn* = «singed» (texture des soies, voir texte) et *y* = corps jaune. (a) Tache de couleur jaune. (b) Taches jumelées. (c) Secteur à soies «singed».

juxtaposition fortuite de taches simples. Ils en déduisit qu'ils devaient être les produits réciproques d'un même événement survenu lors d'une division mitotique au cours de laquelle les chromosomes homologues parentaux s'étaient trouvés par hasard en position d'appariement et qu'un crossing-over s'était produit entre le locus *sn* et le centromère (figure 6-18).

Des taches jumelées ont été observées chez d'autres cellules diploïdes, y compris chez les plantes. Tous les cas observés peuvent être expliqués par la recombinaison mitotique qui apparaît donc comme un phénomène très général chez les eucaryotes, quoique rare.

La définition de la recombinaison mitotique est semblable à celle de la recombinaison méiotique. Le terme **recombinaison mitotique** désigne tout processus mitotique produisant une cellule fille diploïde contenant une combinaison de gènes différente de celle présente dans la cellule parentale où s'est déroulée la mitose. Comparez cette définition à celle de la recombinaison méiotique donnée à la page 126.

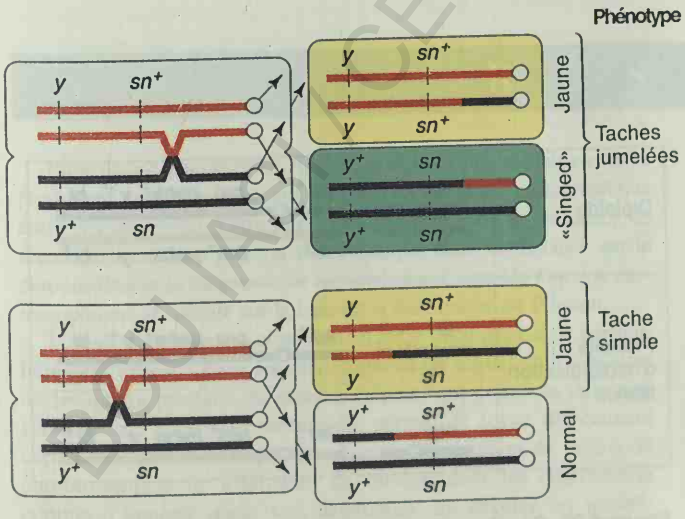
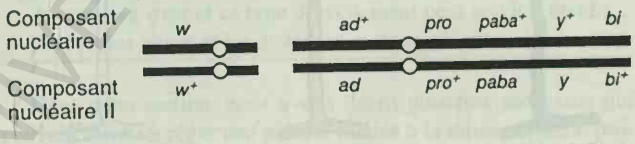


Figure 6-18. Un crossing-over mitotique peut provoquer une ségrégation phénotypique du type de celle montrée à la figure 6-17.

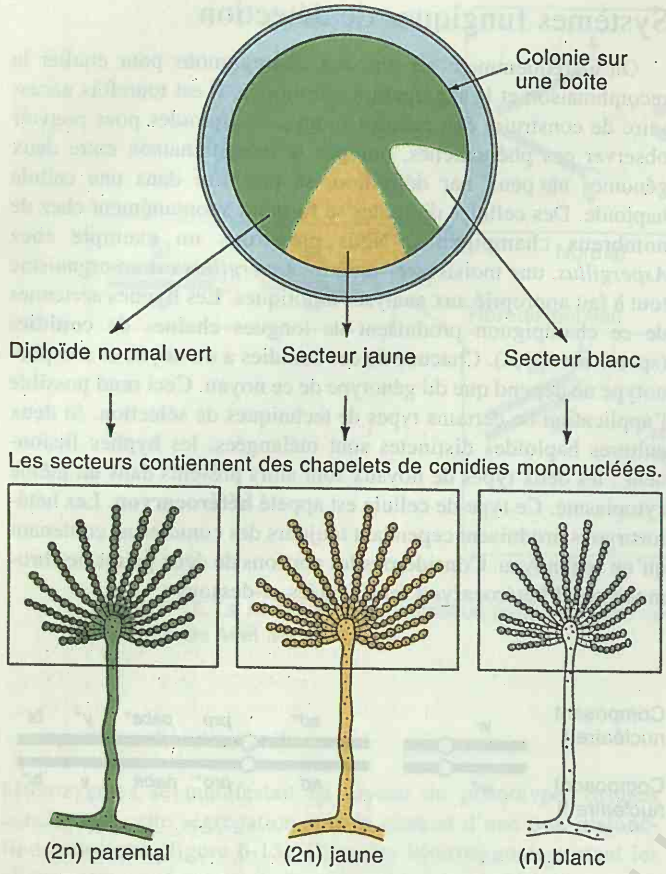
Systèmes fungiques de détection

On a fréquemment recours aux champignons pour étudier la recombinaison et la ségrégation mitotiques. Il est toutefois nécessaire de construire des cellules fungiques diploïdes pour pouvoir observer ces phénomènes, puisque la recombinaison entre deux génomes ne peut, par définition, se produire dans une cellule haploïde. Des cellules diploïdes se forment spontanément chez de nombreux champignons. Nous prendrons un exemple chez *Aspergillus*, une moisissure verdâtre. *Aspergillus* est un organisme tout à fait approprié aux analyses mitotiques. Les hyphes aériennes de ce champignon produisent de longues chaînes de **conidies** (spores asexuées). Chacune de ces conidies a un noyau et son phénotype ne dépend que du génotype de ce noyau. Ceci rend possible l'application de certains types de techniques de sélection. Si deux cultures haploïdes distinctes sont mélangées, les hyphes fusionnent ; les deux types de noyaux sont alors présents dans un même cytoplasme. Ce type de cellule est appelé **hétérocaryon**. Les hétérocaryons produisent cependant toujours des conidies ne contenant qu'un seul noyau. Considérons les portions de deux paires de chromosomes d'hétérocaryon représentées ci-dessous :



Les allèles *ad*, *pro*, *paba*, et *bi* sont tous récessifs. Ils déterminent chacun une exigence nutritionnelle qui fait qu'une substance nutritive spécifique doit être ajoutée au milieu de culture pour permettre la croissance des cellules haploïdes ou homozygotes diploïdes qui les contiennent. Comme l'hétérocaryon contient un allèle sauvage de chaque locus, il n'a besoin d'aucun supplément nutritif pour sa croissance. Les allèles *w* et *y* sont responsables de la couleur blanche ou jaune des conidies. Ces allèles aussi sont récessifs. Les conidies mononucléées produites par l'hétérocaryon seront donc jaunes ou blanches. L'hétérocaryon sera lui-même blanc jaunâtre, on pourrait même dire «poivre et sel».

Des secteurs verts apparaissent chez certains hétérocaryons. Le vert est la couleur normale du champignon de type sauvage et la couleur verte observée dans notre exemple est le résultat de la formation spontanée d'un noyau diploïde dont la propagation a formé un secteur vert. La présence des allèles y^+ et w^+ dominants dans le même noyau produit la coloration sauvage par complémentation. Des conidies diploïdes peuvent être prélevées dans les secteurs verts et mises en culture pour être étudiées. Comme l'hétérocaryon, les cellules diploïdes ne requièrent pas de supplément nutritif pour leur croissance. Après croissance de ces cellules diploïdes, des secteurs, peu nombreux, contenant des conidies blanches ou jaunes peuvent être observés. Certains de ces secteurs sont diploïdes (reconnaissables au grand diamètre de leurs conidies), d'autres sont haploïdes (leurs conidies ont un diamètre plus petit). Deux types de secteurs permettent de mettre en lumière de façon particulièrement appropriée les phénomènes qui se déroulent ici : les secteurs blancs haploïdes et les secteurs jaunes diploïdes (figure 6-19).



(a) (On rencontre également des secteurs jaunes haploïdes et blancs diploïdes.)

(b)

Figure 6-19. (a) Exemples de secteurs où une ségrégation a eu lieu chez un diploïde d'*Aspergillus* de génotype $w^+w\ y^+y$; *w* et *y* déterminent respectivement la couleur blanche ou jaune des spores asexuées. Les cellules haploïdes sont identifiées sur la base de leur plus petite taille. (b) Photo d'un secteur blanc et d'un secteur jaune dans une colonie diploïde. (Reproduite avec l'aimable autorisation de Etta Käfer.)

Secteurs blancs haploïdes. Après isolement, l'analyse de ces secteurs montre que presqu'exactement la moitié d'entre eux a le génotype *w* ad^+ *pro* $paba^+$ y^+ *bi* et l'autre moitié, le génotype *w* *ad* pro^+ *paba y* bi^+. Donc, le noyau originellement diploïde est devenu, d'une façon ou d'une autre, haploïde (un phénomène connu sous le nom d'**haploïdisation**), probablement à la suite de la perte progressive (au cours des générations) d'un membre de chaque paire de chromosomes. En isolant des conidies blanches haploïdes, nous sélectionnons automatiquement le chromosome portant l'allèle *w*. Dans une moitié des secteurs blancs, c'est le chromosome *ad*$^+$ *pro* *paba*$^+$ *y*$^+$ *bi* qui est conservé ; dans l'autre moitié, il s'agit du chromosome *ad* pro^+*paba y* bi^+ (figure 6-20). Les allèles récessifs déterminant une couleur de spores peuvent être utilisés comme marqueurs de référence dans l'établissement des relations de liaison entre gènes, parce que l'haploïdisation est l'équivalent de l'assortiment indépendant. La méthode consiste à sélectionner le chromosome portant le marqueur de couleur des spores, à identifier les gènes qui sont conservés avec lui dans l'haploïde et ceux qui ségrègent indépendamment, et à observer comment ils sont groupés.

Message L'haploidisation produit un effet semblable à l'assortiment indépendant qui peut servir à déterminer la liaison entre les gènes.

Secteurs jaunes diploïdes. Dans la majorité des cas, l'analyse des secteurs jaunes diploïdes révèle qu'ils contiennent des chromosomes recombinants. Prenons l'exemple d'un de ces secteurs qui est jaune et dont la croissance exige la présence de «paba» (acide *para*aminobenzoïque) Rappelons-nous qu'un crossing-over mitotique peut rendre homozygote un locus hétérozygote et donc produire ce type de secteur, comme nous le montre la figure 6-21 qui nous rappelle également que dans l'analyse mitotique, nous devons suivre la migration de deux fibres du fuseau vers chaque

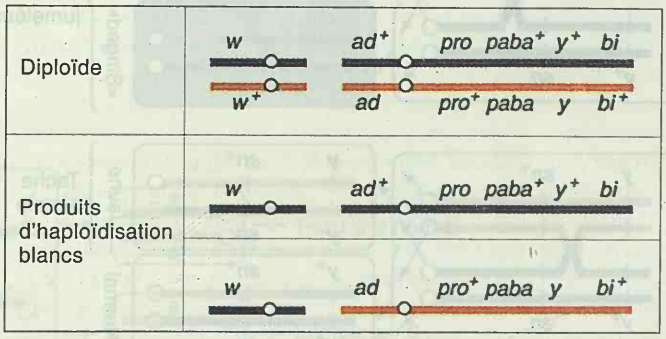


Figure 6-20. Génotype d'une souche diploïde d'*Aspergillus* et des deux produits pouvant résulter de l'haploïdisation des chromosomes représentés ici. (*w* = blanc ; *y* = jaune ; *ad, pro, paba* et *bi* sont des marqueurs nutritionnels récessifs.)

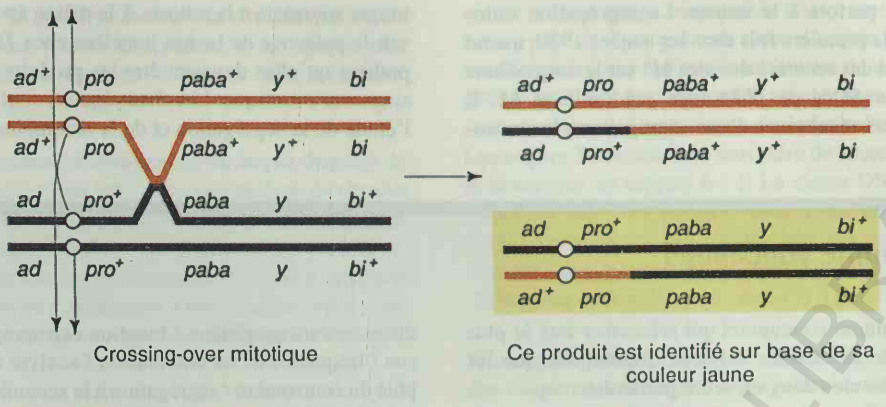


Figure 6-21. Un crossing-over mitotique peut produire un secteur jaune diploïde chez l'*Aspergillus* diploïde représenté ici. Observez que le crossing-over rend homozygotes tous les loci hétérozygotes distaux.

pôle. Bien que les paires de chromatides n'occupent *habituellement pas* des positions adjacentes, cela s'est produit ici par hasard. Le diploïde jaune en question, qui exige le paba, est manifestement le produit d'un échange mitotique dans l'intervalle centromère-*paba* ; d'autres pourraient être produits par des échanges mitotiques dans l'intervalle *paba-y* (et pourraient dès lors croître en absence de paba). Le rapport des fréquences d'apparition de ces deux types de recombinants devrait permettre d'établir une carte de la liaison entre gènes à la mitose. On peut se livrer à ce genre de cartographie chez plusieurs champignons. Comme on s'y attend, l'ordre des gènes établi de la sorte correspond à celui établi par l'analyse méiotique, mais ce qui est inattendu, par contre, c'est que les longueurs relatives de beaucoup d'intervalles entre loci sont très différentes lorsqu'on compare les cartes méiotiques et mitotiques. On ne connaît pas encore la raison de cette différence. Observez qu'un crossing-over mitotique rend homozygote chaque locus situé entre le point de crossing-over et l'extrémité du bras du chromosome. Ceci constitue une information précieuse pour la cartographie. Comme les expériences de recombinaison mitotique sont réalisées sur des cultures de champignons en croissance végétative rapide, les résultats sont obtenus plus rapidement que par l'analyse méiotique qui comporte une phase sexuelle plus lente.

Message Un crossing-over mitotique peut rendre homozygotes toutes les paires de gènes distales par rapport au point de crossing-over et ce type d'événement peut servir à établir l'ordre des gènes et les distances cartographiques.

Dans cette section, nous avons décrit plusieurs processus qui peuvent faire ségréger une paire d'allèles à la mitose et donc produire des phénotypes différents. Dans des chapitres ultérieurs, nous verrons qu'il existe en fait plusieurs autres processus génétiques susceptibles de causer la panachure, mais à ce stade, nous pouvons résumer le phénomène comme suit :

Message A la suite d'une non-disjonction mitotique, de la perte d'un chromosome à la mitose ou d'un crossing-over mitotique, les allèles d'une paire hétérozygote peuvent ségréger, ce qui produit une panachure des tissus (la présence de secteurs de phénotypes différents dans un tissu).

RÉSUMÉ

Etant donné la probabilité élevée que de multiples crossing-over se produisent entre des loci très éloignés, la distance cartographique entre ces loci cesse d'être une fonction linéaire de la fréquence de recombinaison. Une relation mathématique entre la distance sur le chromosome et la fréquence de recombinaison, appelée *fonction cartographique*, se calcule sur la base de la distribution de Poisson.

L'analyse de tétrades constitue un autre outil génétique particulièrement efficace chez les champignons ou algues unicellulaires où les quatre produits de chaque méiose sont contenus dans une sorte de sac. L'analyse de tétrades permet de tester directement certaines hypothèses implicites dans la formulation de la théorie chromosomique de l'hérédité, de cartographier les centromères comme n'importe quels loci génétiques, de déceler les interférences chromatidiques éventuelles, d'étudier les mécanismes régissant les échanges entre chromosomes et de caractériser des jeux de chromosomes anormaux.

Les tétrades peuvent se présenter sous forme linéaire ou sous forme non ordonnée. L'analyse de tétrades linéaires permet de mesurer la liaison marqueurs-centromère aussi bien que les liaisons entre marqueurs eux-mêmes. Dans des croisements entres parents qui diffèrent au niveau de marqueurs à deux loci liés, les asques, tant à tétrades linéaires que non ordonnées, se répartissent en fonction du génotype des spores en ditypes parentaux (DP), ditypes non parentaux (DNP) et tétratypes (T). La mesure de ces classes permet de calculer la fréquence de recombinaison (FR) selon la fomule FR = 1/2T + DNP. Une formule dérivée - 50(T + 6 DNP) u.c. fournit une distance cartographique corrigée pour les crossing-over multiples. L'analyse de tétrades non ordonnées permet donc d'introduire dans la cartographie une correction simple qui tient compte des crossing-over multiples.

Bien que la ségrégation et la recombinaison soient normalement considérées comme des phénomènes méiotiques, elles se

produisent néanmoins parfois à la mitose. La ségrégation mitotique fut décelée pour la première fois dans les années 1930, quand Calvin Bridges observa des secteurs de soies M^+ sur le corps d'une femelle de *Drosophila* M^+M de phénotype prédominant M. Il conclut que ces secteurs résultaient d'une ségrégation chromosomique anormale à la mitose. A la même époque, Curt Stern découvrit la présence de taches jumelées chez *Drosophila* et émit l'hypothèse qu'elles devaient être les produits réciproques d'un crossing-over mitotique. Les champignons sont beaucoup utilisés dans l'étude de la ségrégation et de la recombinaison mitotiques.

Diagramme conceptuel

Dessinez un diagramme conceptuel qui relie entre eux le plus grand nombre possible des termes suivants. Remarquez que les termes ne sont pas présentés dans un ordre particulier.

distance cartographique / fonction cartographique / carte de liaison / fréquence de recombinaison / analyse de tétrades / cartographie du centromère / ségrégation à la seconde division / correction pour les doubles crossing-over / méioses individuelles

PROBLÈMES DE SYNTHÈSE

Des souches haploïdes du champignon *Neurospora* qui portent l'allèle *am* ne poussent que si de l'alanine est ajoutée au milieu de croissance. Des souches sauvages poussent sans addition d'alanine. Un gène suppressseur *ssu* est lié au locus *am*. L'allèle *ssu* supprime l'exigence d'alanine, donc les souches *am ssu* poussent sans addition d'alanine. L'allèle *ssu* n'a pas d'effet sur les l'allèle sauvage am^+ et l'allèle sauvage ssu^+ n'a pas d'effet connu sur les allèles au locus *am*.

On a calculé que le nombre de méioses à crossing-over triples (ou d'ordre plus élevé) est négligeable dans la région comprise entre *am* et *ssu*. Il y a donc des méioses sans crossing-over (41 pour cent), à un seul crossing-over (39 pour cent) et à deux crossing-over (20 pour cent). Sur la base de cette information, répondez aux questions suivantes :

a. Dans quelle mesure ce système génétique dépend-t-il du milieu environnant ?

b. Quelle est la valeur de la fréquence de recombinaison (FR) ?

c. Si on analyse un échantillon aléatoire d'ascospores issues du croisement *am ssu* × am^+ ssu^+, quelle proportion aura -t - elle besoin d'alanine pour pousser ?

d. Quelle est la distance entre les loci en unités cartographiques corrigées ?

e. Si des asques du croisement *am ssu* × am^+ ssu^+ sont analysés comme des tétrades non ordonnées, quelle sera la proportiondes cinq profils phénotypiques suivants :

Profil	Nombre d'ascospores qui n'exigent pas d'alanine	Nombre d'ascospores qui exigent l'alanine
(1)	8	0
(2)	6	2
(3)	4	4
(4)	2	6
(5)	0	8

Solution

a. Le seul aspect de l'environnement qui est mentionné est la présence ou l'absence d'alanine dans le milieu de culture. S'il y a de l'alanine dans le milieu, nous ne pouvons identifier les deux phénotypes de base : croissance ou absence de croissance. Par conséquent, la possibilité d'étudier et d'analyser cet intéressant exemple d'interaction entre gènes dépend de l'environnement puisque ce qui conditionne toute analyse génétique est la variation. Un autre point qui mérite d'être souligné est que l'allèle *am* serait probablement létal dans un environnement naturel ; ce n'est que parce que les généticiens cultivent de tels phénotypes, donc qu'ils les propagent dans un milieu synthétique particulier – c'est-à-dire un environnement particulier – qu'ils sont disponibles pour l'analyse génétique.

b. Ce chapitre nous a fourni une formule pour calculer la FR à partir des résultats de l'analyse de tétrades. Nous avons appris que FR = T/2 + DNP. Nous devons calculer les valeurs de T et de DNP. On nous donne les fréquences des méioses à 0, 1 et 2 crossing-over et nous avons appris comment les asques DP, DNP et T sont produits au cours de ces méioses. Tous les asques sans crossing-over sont DP et leur contribution à la classe DP est 41 pour cent. Les crossing-over simples sont faciles à traiter eux aussi : ils ne produisent que des asques T, donc contribuent pour 39 pour cent à la classe T. Les crossing-over doubles sont un peu plus compliqués, mais nous avons vu qu'ils produisent $\frac{1}{4}$ DP, $\frac{1}{2}$ T et $\frac{1}{4}$ DNP, ce qui se traduit par 5 pour cent de DP, 10 pour cent de T et 5 pour cent de DNP. En additionant ces pourcentages, nous obtenons 46 pour cent de DP, 49 pour cent de T et 5 pour cent de DNP. Nous pouvons calculer la valeur de FR qui est $\frac{49}{2}$ + 5 = 29,5 pour cent.

c. Nous nous attendons à présent à obtenir 29,5 pour cent d'asques recombinants à partir du croisement, avec 14,75 pour cent de *am* ssu^+ et 14,75 pour cent de am^+ *ssu*. Les deux classes parentales sont am^+ ssu^+ et *am ssu* et nous nous attendons à ce qu'elles représentent chacune la moitié de la différence 100 – 29,5 = 70,5 pour cent, soit 39,25 pour cent. Parmi ces quatre génotypes, lesquels exigeront - ils l'alanine ? Manifestement pas am^+ ssu^+ ni *am ssu*. Le génotype am^+ *ssu* ne va pas davantage exiger l'alanine puisqu'il comporte l'allèle *am* sauvage et que nous savons que *ssu* n'affecte

pas cet allèle. Toutefois, le génotype *am ssu*$^+$ ne contient pas l'allèle suppresseur et il faudra fournir de l'alanine à ces spores pour qu'elles poussent. La réponse est donc 14,75 pour cent, la fréquence de cette dernière classe.

d. Nous avons appris dans ce chapitre que le fait de disposer de la fréquence des DP, des T et des DNP dans une analyse de tétrades non ordonnées nous permet de corriger la distance cartographique (FR) pour tenir compte des crossing-over doubles qui sont responsables d'une sous-estimation de la distance. La formule à appliquer est 50 (T + 6 DNP). Si nous l'appliquons à nos résultats, nous obtenons 50 (0,49 + 0,30), ce qui nous donne 39,5 unités cartographiques corrigées.

e. Une bonne partie du raisonnement nécessaire pour répondre à cette partie de la question a déjà été faite puisque nous avons déduit que le seul génotype responsable d'une auxotrophie pour l'alanine est *am ssu*$^+$. Il n'y a que trois types d'asques possibles dans l'analyse de tétrades non ordonnées au niveau de deux loci hétérozygotes (DP, T et DNP). Les asques DP ne contiennent pas le génotype *am ssu*$^+$, de sorte que cette classe d'asques présentera un rapport 8 : 0. Les asques T contiendront une paire de spores de génotype *am ssu*$^+$ et donneront un rapport 6 : 2. La classe DNP comprendra 4 ascospores *am ssu*$^+$ et quatre *am*$^+$ *ssu*, ce qui donnera un rapport 4 : 4. Ceci couvre toutes les possibilités, de sorte que nous pouvons répondre que les proportions dans le tableau sont (1) 46 pour cent, (2) 49 pour cent, (3) 5 pour cent, (4) 0 pour cent, (5) 0 pour cent.

Remarquez que nous avons fait appel à des concepts introduits dans des chapitres précédents : ségrégation de type mendélien, hérédité chromosomique, interaction entre gènes, effets létaux, effets de l'environnement, crossing-over et cartographie.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. On effectue un croisement chez *Neurospora* entre une souche haploïde de génotype *nic*$^+$ *ad* et une autre, haploïde également, de génotype *nic ad*$^+$. 1000 asques issus de ce croisement sont isolés et répartis en classes de la façon suivante :

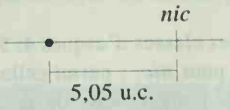
1	2	3	4	5	6	7
nic$^+$ *ad*	*nic*$^+$ *ad*$^+$	*nic*$^+$ *ad*$^+$	*nic*$^+$ *ad*	*nic*$^+$ *ad*	*nic*$^+$ *ad*$^+$	*nic*$^+$ *ad*$^+$
nic$^+$*ad*	*nic*$^+$ *ad*$^+$	*nic*$^+$*ad*$^+$	*nic*$^+$ *ad*	*nic*$^+$ *ad*	*nic*$^+$ *ad*$^+$	*nic*$^+$ *ad*$^+$
nic$^+$ *ad*	*nic*$^+$ *ad*$^+$	*nic*$^+$ *ad*	*nic ad*	*nic ad*$^+$	*nic ad*	*nic ad*
nic$^+$ *ad*	*nic*$^+$ *ad*$^+$	*nic*$^+$ *ad*	*nic ad*	*nic ad*$^+$	*nic ad*	*nic ad*
nic ad$^+$	*nic ad*	*nic ad*$^+$	*nic*$^+$ *ad*$^+$	*nic*$^+$ *ad*	*nic*$^+$ *ad*$^+$	*nic*$^+$ *ad*
nic ad$^+$	*nic ad*	*nic ad*$^+$	*nic*$^+$ *ad*$^+$	*nic*$^+$ *ad*	*nic*$^+$ *ad*$^+$	*nic*$^+$ *ad*
nic ad$^+$	*nic ad*	*nic ad*	*nic ad*$^+$	*nic ad*$^+$	*nic ad*	*nic ad*$^+$
nic ad$^+$	*nic ad*	*nic ad*	*nic ad*$^+$	*nic ad*$^+$	*nic ad*	*nic ad*$^+$
808	1	90	5	90	1	5

Cartographiez les loci *ad* et *nic* par rapport à leur(s) centromère(s) et l'un par rapport à l'autre.

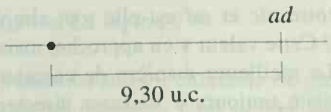
Solution

Sur quel principe nous baser pour résoudre ce problème ? Il est toujours judicieux de commencer par faire quelque chose de simple et d'immédiat ; en l'occurence, calculons les distances par rapport au centromère.Nous ne savons pas si *ad* et *nic* sont liés, mais nous n'avons pas besoin de le savoir. La fréquence du profil M_{II} pour chacun des deux loci nous donne la distance qui les sépare de leur centromère, qu'il s'agisse ou non du même.(Nous nous préoccuperons de cela plus tard.)

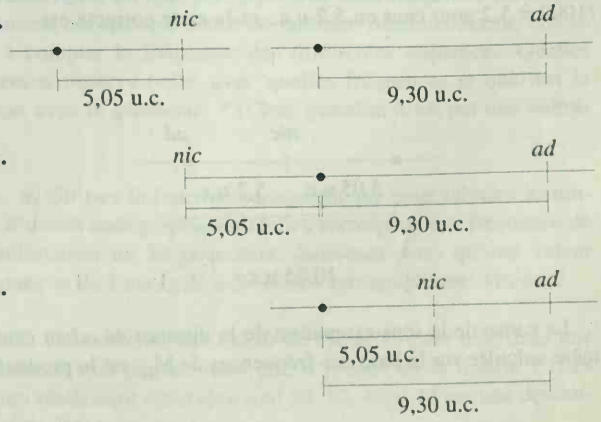
Souvenez-vous qu'un profil M_{II} est n'importe quel profil qui ne soit pas constitué de deux blocs de quatre génotypes identiques. Commençons par la distance du locus *nic* au centromère. Il suffit d'additionner les asques des classes 4, 5, 6 et 7, qui présentent tous un profil M_{II} pour le locus *nic*. Le total est 5 + 90 + 1 + 5 = 101, soit 10,1 pour cent. Dans ce chapitre, nous avons vu que pour convertir cette valeur en unités cartographiques, il convient de la diviser par 2, donc la distance est de 5,05 u.c.



Faisons maintenant la même chose pour le locus *ad*. Ici, le total des schémas M_{II} correspond à la somme des asques des types 3, 5, 6 et 7. Ce total se monte à 90 + 90 + 1 + 5 = 186, soit 18,6 pour cent, ce qui équivaut à 9,3 u.c.

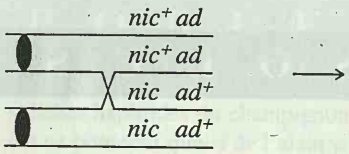


A présent, nous devons réunir ces deux résultats et décider laquelle parmi les organisations génétiques suivantes, toutes compatibles avec les distances par rapport au centromère que nous venons d'établir, correspond à la réalité.



C'est une combinaison de bon sens et d'analyse simple qui va nous livrer la solution. Tout d'abord, un examen des asques nous montre qu'une classe, que nous avons désignée par le numéro 1, est de loin la plus importante puisqu'elle comprend plus de 80 pour cent des asques. Cette classe contient uniquement les génotypes *nic*$^+$ *ad* et *nic ad*$^+$ qui sont les génotypes *parentaux*. Nous savons ainsi que la recombinaison entre les deux loci est peu importante et qu'ils sont certainement liés. Ceci élimine la solution a.

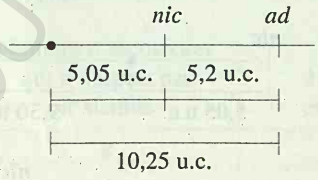
Considérons la situation c ; si celle-ci était correcte, un crossing-over entre le centromère et *nic* devrait produire un profil M_{II} non seulement pour ce locus, mais aussi pour *ad* qui est distal. L'organisation des asques correspondants devrait être



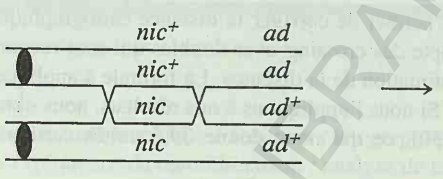
nic$^+$ *ad*
nic$^+$ *ad*
nic *ad*$^+$
nic *ad*$^+$
nic$^+$ *ad*
nic$^+$ *ad*
nic *ad*$^+$
nic *ad*$^+$

Rappelons-nous que les classes d'asques 4, 5, 6 et 7 (un total de 101 asques) sont M_{II} pour *nic.* ; parmi celles-ci, la classe 5 est précisément celle que nous venons de décrire et contient 90 asques. La solution c semble donc correcte parce que les asques de type 5 constituent à peu près 90 pour cent des asques qui sont M_{II} pour *nic*. Cette corrélation ne serait pas observée si la solution b était correcte, parce que des crossing-over de part et d'autre du centromère devraient aboutir à des schémas M_{II} indépendants pour *nic* et *ad*.

La distance entre *nic* et *ad* est-elle tout simplement 9,30 – 5,05 = 4,25 u.c. ? Cette valeur s'en approche, mais n'est pas tout à fait correcte. La meilleure manière de calculer les distances entre gènes consiste toujours à mesurer directement leur fréquence de recombinaison (FR). Nous pourrions passer les asques en revue et compter les ascospores recombinantes, mais il est plus simple d'appliquer la formule RF = $\frac{1}{2}$ T + DNP. Même si les asques sont linéaires, ils peuvent toujours être classés en DP, DNP et T. Les asques T sont représentés par les classes 3, 4 et 7, et les asques DNP par les classes 2 et 6. D'où, FR = [$\frac{1}{2}$ (100) + 2] /1000 = 5,2 pour cent ou 5,2 u.c., et la carte correcte est



La cause de la sous-estimation de la distance de *ad* au centromère calculée sur la base des fréquences de M_{II}, est la production de doubles crossing-over, lesquels font apparaître un profil de type M_I pour *ad*, comme dans les asques de type 4 :



nic$^+$ *ad*
nic$^+$ *ad*
nic *ad*
nic *ad*
nic$^+$ *ad*$^+$
nic$^+$ *ad*$^+$
nic *ad*$^+$
nic *ad*$^+$

2. Chez *Aspergillus*, les allèles récessifs *leu1, met5, thi3, pro2* et *ad2*, localisés sur le chromosome VI, déterminent respectivement l'auxotrophie pour la leucine, la méthionine, la thiamine, la proline et l'adénine. Les allèles sauvages correspondants ne confèrent pas d'auxotrophie. A l'extrémité du chromosome VI, se trouve le locus d'un gène dont l'allèle récessif *su* supprime *ad2*, de sorte que les souches exprimant *ad2* et *su* croissent en absence d'adénine. On construit une souche diploïde en combinant les génotypes haploïdes suivants dans lesquels les loci, à l'exception de *su*, sont écrits sans tenir compte de l'ordre cartographique :

su, leu1, met5, thi3, pro2, ad2

et

su$^+$, *leu1*$^+$, *met5*$^+$, *thi3*$^+$, *pro2*$^+$, *ad2*

On étale les spores asexuées diploïdes sur un milieu contenant tous les suppléments nutritifs requis sauf l'adénine. La majorité des spores ne peut croître à cause du caractère récessif de *su*, mais une minorité forme des colonies ; 100 d'entre elles sont isolées et analysées pour les phénotypes des autres marqueurs. On trouve les quatre classes suivantes notez qu'il s'agit de phénotypes diploïdes et non de génotypes haploïdes) :

1.	*su*	LEU$^+$	MET$^-$	THI$^+$	PRO$^+$	AD$^-$ 60
2.	*su*	LEU$^-$	MET$^-$	THI$^+$	PRO$^+$	AD$^-$ 25
3.	*su*	LEU$^+$	MET$^+$	THI$^+$	PRO$^+$	AD$^-$ 10
4.	*su*	LEU$^-$	MET$^-$	THI$^-$	PRO$^+$	AD$^-$ 5

a. Expliquez comment sont produites ces quatre classes et ce qui détermine leurs abondances respectives.

b. Pourquoi, selon vous, aucune colonie *pro2* n'est-elle récupérée ?

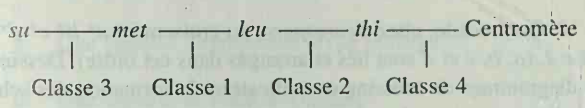
Solution

a. L'expérience étudie le comportement de cellules diploïdes à la mitose ; par conséquent, les quatre classes peu abondantes doivent être produites par un mécanisme asexué. Il semble probable

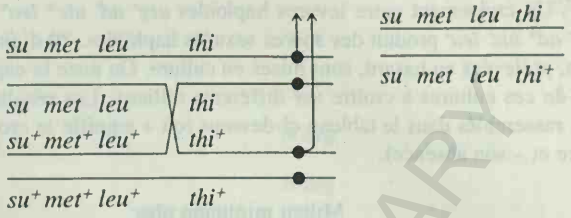
BCU IA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

que l'allèle *su* soit devenu homozygote *su / su* dans toutes les classes, parce que ce n'est que dans cette situation qu'il peut supprimer *ad2* chez un homozygote *ad2 / ad2* et lui permettre de croître en absence d'adénine. C'est donc sur cette base que les 100 colonies ont été sélectionnées. Evidemment, d'autres allèles sont également devenus homozygotes, selon des combinaisons qui varient avec les classes.

Nous avons montré dans ce chapitre qu'un crossing-over mitotique peut rendre homozygote n'importe quel allèle récessif distal. Pouvons-nous expliquer la formation des différentes classes par la production de crossing-over mitotiques en différentes régions du chromosome VI ? L'examen des différentes classes nous montre que l'homozygotie peut apparaître soit uniquement pour *su* (classe 3), soit pour *su* et *met* (classe 1), soit pour *su, met* et *leu* (classe 2) soit encore pour *su, met, leu* et *thi* (classe 4). Cet examen nous révèle sans ambigüité que l'ordre doit être *su-met-leu-thi-* centromère. Les crossing-over responsables des homozygoties doivent dès lors se produire comme suit :



Par exemple, le crossing-over suivant est nécessaire pour produire la classe 2 :



L'abondance relative des différentes classes doit refléter la taille des intervalles entre les loci :

Remarquez que ces «unités» sont des abondances relatives de classes et non des unités cartographiques méiotiques.

b. On nous a dit que *pro2* est sur le chromosome VI, cependant, il n'apparaît à l'état homozygote dans aucune des quatre classes observées. Il est important de souligner que dans notre sélection de recombinants mitotiques, nous utilisons un marqueur situé à l'extrémité d'un bras de chromosome. Les crossing-over sélectionnés ne devraient pas avoir d'effet sur des loci situés sur l'autre bras du chromosome, donc *pro2* se trouve probablement sur l'autre bras. Nous ne disposons d'aucune méthode permettant de déterminer où se trouve *ad2*, puisque ce locus est homozygote au départ.

PROBLÈMES

1. On effectue chez *Neurospora* le croisement *al-2*$^+$ × *al-2*. L'analyse de tétrades linéaires révèle que la fréquence de ségrégation à la seconde division est de 8 pour cent.

a. Dessinez deux schémas de ségrégation à la seconde division dans ce croisement.

b. Que peut-on calculer à partir de la valeur de 8 pour cent ?

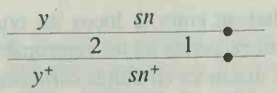
2. Quel seront les génotypes des spores issues d'un croisement de champignons *arg-6 al-2* × *arg-6*$^+$ *al-2*$^+$, dans les tétrades non ordonnées correspondant aux schémas

a. Ditype parental ? **b.** Tétratype ? **c.** Ditype non parental ?

3. Dans une région déterminée d'un chromosome, le nombre moyen de crossing-over par méiose est de 2. Dans cette région, quelle proportion des méioses se fera-t-elle

a. Sans crossing-over ? **b.** Avec 1 crossing-over ? **c.** Avec 2 crossing-over ?

4. Chez une drosophile de génotype



y signifie la couleur jaune du corps (+ = corps brun) et *sn* (*singed*), des soies courtes et recroquevillées (+ = soies normales). Quels phénotypes peut-on observer si, durant le développement, un crossing-over mitotique se produit dans

a. La région 1 ? **b.** La région 2 ?

5. Tous les vendredis soirs, l'étudiante en génétique Jeannette Allèle, épuisée par ses études, se rend au bowling du cercle facultaire pour s'y détendre un peu. Même là, la génétique la poursuit. La modeste piste de bowling n'est équipée que de quatre boules : deux rouges et deux bleues. Elles sont lancées vers les quilles, puis sont récupérées et ramenées vers les joueurs par un toboggan dans lequel elles reviennent sans ordre précis. Au cours de la soirée, Jeannette remarque que les séquences dans lesquelles les boules reviennent ont quelque chose de familier. Machinalement, elle se met à compter la fréquence des différentes séquences. Quelles séquences observe-t-elle, avec quelles fréquences et quel est le rapport avec la génétique ? (Cette question n'est pas une «attrape»).

6. **a.** Utilisez la fonction cartographique pour calculer à combien d'unités cartographiques réelles correspond une fréquence de recombinaison de 20 pour cent. Souvenez vous qu'une valeur moyenne *m* de 1 est égale à 50 unités cartographiques vraies.

b. Si vous obtenez une valeur de FR de 45 pour cent dans une expérience, que pouvez-vous dire à propos de la liaison ? (Les valeurs réellement observées sont 58, 52, 47 et 43 sur une descendance de 200 individus.)

BOUTEST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7. Un croisement entre levures haploïdes *arg⁻ ad⁻ nic⁺ leu⁺* et *arg⁺ ad⁺ nic⁻ leu⁻* produit des spores sexuées haploïdes. 20 d'entre elles, prélevées au hasard, sont mises en culture. On teste la capacité de ces cultures à croître sur différents milieux. Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-dessous (où + signifie la croissance et – son absence).

	Milieu minimum plus			
Culture	Arginine, adénine, nicotinamide	Arginine, adénine, leucine	Arginine, nicotinamide, leucine	Adénine, nicotin amide, leucine
1	+	+	–	–
2	–	–	+	+
3	–	+	–	+
4	+	–	+	–
5	–	–	+	+
6	+	+	–	–
7	+	+	–	–
8	–	–	+	+
9	+	–	+	–
10	–	+	–	+
11	–	+	–	+
12	+	–	+	–
13	+	+	–	–
14	+	–	+	–
15	–	+	–	+
16	+	–	–	–
17	+	+	–	–
18	–	–	+	+
19	+	+	–	–
20	–	+	–	+

a. Que pouvez-vous dire de la liaison de ces gènes ?

b. Quels sont les événements génétiques qui ont produit la culture 16 ?

8. Vous mesurez la fréquence de recombinaison entre les loci liés waxy (*wx*) et shrunken (*sh*) sur le chromosome 9 du maïs. La FR est de 36 pour cent. Dans quelle proportion trouvez-vous des méiocytes où se sont produits :

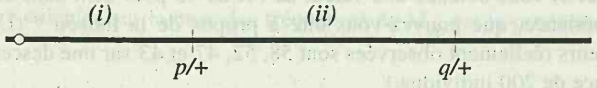
a. zéro crossing-over entre les loci *wx* et *sh* ?

b. un crossing-over entre les loci *wx* et *sh* ?

c. deux crossing-over entre les loci *wx* et *sh* ?

d. au moins un crossing-over entre les loci *wx* et *sh* ?

***9.** Dans une analyse de tétrades, la disposition des loci *p* et *q* est la suivante :



Supposez que

- Dans la région (i), seuls deux schémas sont possibles à la méiose : pas de crossing-over (88 pour cent des méioses) ou un seul crossing-over (12 pour cent des méioses).
- Dans la région (ii), les deux seuls schémas possibles à la méiose sont : pas de crossing-over (80 pour cent des méioses) ou un seul crossing-over (20 pour cent des méioses).
- Il n'y a pas d'interférence (en d'autres termes, les événements dans une région n'ont pas d'effet sur la région voisine).

Quelles proportions de tétrades seront-elles des types suivants ? a) M_IM_I.DP ; b) M_IM_I.DNP ; c) M_IM_{II}.T ; d) $M_{II}M_I$.T ; e) $M_{II}M_{II}$.DP ; f) $M_{II}M_{II}$.DNP ; g) $M_{II}M_{II}$.T. (REMARQUE : Le profil M écrit en premier est celui qui se rapporte au locus *p*) Voici un tuyau : La façon la plus facile de résoudre ce problème est de commencer à calculer les fréquences des asques avec des crossing-over dans les deux régions, dans la région (i), dans la région (ii) ou dans aucune, puis de déterminer quels profils de ségrégation en résultent.

10. On procède, chez *Neurospora*, au croisement $a^+ b^+ c^+ d^+ \times a\ b\ c\ d$. (*a, b, c* et *d* sont liés et arrangés dans cet ordre). Dessinez les diagrammes de crossing-over illustrant la formation des schémas d'asques non ordonnés suivants :

a. $a^+ b^+ c\ d^+$ / $a\ b\ c\ d^+$ / $a^+ b\ c^+ d$ / $a\ b^+ c^+ d$

b. $a^+ b\ c\ d$ / $a^+ b^+ c^+ d$ / $a\ b\ c\ d^+$ / $a\ b^+ c^+ d^+$

c. $a^+ b^+ c\ d^+$ / $a^+ b\ c^+ d$ / $a\ b^+ c\ d^+$ / $a\ b\ c^+ d$

d. $a^+ b\ c^+ d$ / $a^+ b\ c^+ d$ / $a\ b^+ c\ d^+$ / $a\ b^+ c\ d^+$

e. $a^+ b\ c\ d$ / $a\ b\ c\ d^+$ / $a^+ b^+ c^+ d$ / $a\ b^+ c^+ d^+$

f. $a^+ b\ c^+ d$ / $a^+ b^+ c^+ d$ / $a\ b\ c\ d^+$ / $a\ b^+ c\ d^+$

g. $a^+ b\ c^+ d^+$ / $a^+ b\ c^+ d^+$ / $a\ b^+ c\ d$ / $a\ b^+ c\ d$

h. $a^+ b\ c^+ d$ / $a\ b^+ c\ d^+$ / $a^+ b\ c^+ d$ / $a\ b^+ c\ d^+$

11. Deux souches de *Neurospora* sont croisées : l'une est de type conjugant *A* et porte l'allèle mutant *arg-1*, l'autre est de type conjugant *a* et porte l'allèle *arg-1* sauvage (+). L'analyse de 400 tétrades linéaires fait apparaître les sept classes suivantes (chaque classe présente les spores dans plusieurs ordres différents) :

1	2	3	4	5	6	7
A arg	*A +*	*A arg*	*A arg*	*A arg*	*A +*	*A +*
A arg	*A +*	*A +*	*A arg*	*a +*	*a arg*	*a arg*
a +	*a arg*	*a arg*	*A +*	*A arg*	*A +*	*A arg*
a +	*a arg*	*a +*	*a +*	*a +*	*a arg*	*a +*
127	125	100	36	2	4	6

a. Déduisez la liaison entre le locus du type conjugant et le locus *arg-1*. Positionnez ausi le ou les centromères sur votre carte. Exprimez *toutes* les distances en unités cartographiques.

b. Représentez les divisions méiotiques qui ont produit la classe de tétrades numéro 6.

BOUVAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Décomposons le problème

a. Les champignons sont-ils généralement haploïdes ou diploïdes ?

b. Combien d'ascospores contenient dans l'asque de *Neurospora* ? Votre réponse s'accorde - t - elle avec le nombre figurant dans ce problème ? Epliquez une différence éventuelle.

c. Qu'est-ce que le type conjugant des champignons ? Comment le caractériser expérimentalement ?

d. Les symboles *A* et *a* ont-ils un rapport avec la dominance et la récessivité ?

e. Que signifie le symbole *arg-1* ? Comment mettre ce génotype en évidence ?

f. Quelle est la relation de *arg-1* au symbole + ?

g. Que signifie l'expression «type sauvage» ?

h. Que signifie le vocable «mutant» ?

i. La fonction des allèles représentés dans le problème a- t - elle un rapport avec la solution ?

j. Que signifie l'expression «*analyse de tétrades linéaires*» ?

k. Que peut - on apprendre de plus de l'analyse de tétrades linéaires que de celle de tétrades non-ordonnées ?

l. Comment s'effectue un croisement chez le champignon ascomycète *Neurospora* ? Décrivez l'isolement d'asques et des ascospores individuelles. Quelle différence y a - t - il entre *tétrade*, *asque* et *octade* ?

m. Où a lieu la méiose dans le cycle vital de *Neurospora* ? (Indiquez l'endroit sur un schéma du cycle cellulaire.)

n. Quel rapport la question *m* ci-dessus a - t - elle avec la méiose ?

o. Ecrivez les génotypes des deux souches parentales.

p. Pourquoi n'y a - t - il que quatre génotypes représentés dans chaque classe ?

q. Pourquoi n'y a - t - il que sept classes ? Combien de manières de classer les tétrades avez - vous apprises ? Laquelle de ces classifications s'applique - t - elle aussi bien aux tétrades linéaires qu'aux tétrades non-ordonnées ? Pouvez - vous appliquer ces classifications aux tétrades représentées dans ce problème ? D'autres tétrades sont - elles possibles dans ce croisement ? Si c'est le cas, pourquoi ne sont - elles pas représentées ?

r. Que signifie la phrase «chaque classe d'asque présentait les spores dans plusieurs ordres différents» ? Pourquoi ces ordres de spores différents ne justifient - t - ils pas une classification différente ?

s. Pourquoi la classe

a +

a +

A arg

A arg

n'est - elle pas représentée ?

t. Que signifie l'expression «liaison entre loci» ?

u. Qu'est - ce qu'un intervalle génétique ?

v. Pourquoi l'énoncé du problème mentionne - t - il « le ou les entromères» ? Quelle est la méthode à suivre pour cartographier les centromères dans l'analyse de tétrades ?

w. Quelle est la fréquence totale d'apparition des ascospores *A* + ? L'avez-vous établie en vous servant d'une formule ou par inspection ? S'agit - il d'un génotype recombinant ? Si c'est le cas, est - ce le seul ?

x. Les deux premières classes sont les plus abondantes et se produisent avec des fréquences approximativement égales. Qu'en déduisez - vous ? Combien de génotypes parentaux et recombinants contiennent - elles ?

12. Une souche du champignon *Neurospora*, auxotrophe pour la thiamine (allèle mutant *t*), est croisée avec une souche auxotrophe pour la méthionine (allèle mutant *m*). Des asques linéaires ont été isolés et classés en groupes selon le profil suivant :

Paires de spores	Types d'asques					
1 et 2	*t* +	*t* +	*t* +	*t* +	*t m*	*t m*
3 et 4	*t* +	*t m*	+ *m*	+ +	*t m*	+ +
5 et 6	+ *m*	+ +	*t* +	*t m*	+ +	*t* +
7 et 8	+ *m*	+ *m*	+ *m*	+ *m*	+ +	+ *m*
Nombre	260	76	4	54	1	5

a. Déterminez la liaison de ces deux gènes entre eux ainsi qu'au centromère ou aux centromères. Exprimez les distances en unités cartographiques.

b. Faites un schéma pour montrer l'origine de chaque type d'asque.

c. Si 1000 ascospores choisies au hasard sont étalées sur une boîte de milieu minimum, combien formeront des colonies ?

13. Des croisements de type $a\,b \times a^{+}b^{+}$ (dans lesquels *a* et *b* représentent des loci différents dans chaque croisement) sont effectués chez *Neurospora*. 100 asques linéaires issus de chaque croisement sont analysés. Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous. Pour chaque croisement, cartographiez les gènes l'un par rapport à l'autre et par rapport à leur(s) centromère(s) res-

BOU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

pectifs.

Croisement	Nombre d'asques de type						
	$a\ b$	$a\ b^+$	$a\ b$	$a\ b$	$a\ b$	$a\ b^+$	$a\ b^+$
	$a\ b$	$a\ b^+$	$a\ b^+$	a^+b	a^+b^+	a^+b	a^+b
	a^+b^+	a^+b	a^+b^+	a^+b^+	a^+b^+	a^+b	a^+b^+
	a^+b^+	a^+b	a^+b	$a\ b^+$	$a\ b$	$a\ b^+$	$a\ b$
1	34	34	32	0	0	0	0
2	84	1	15	0	0	0	0
3	55	3	40	0	2	0	0
4	71	1	18	1	8	0	1
5	9	6	24	22	8	10	20
6	31	0	1	3	61	0	4
7	95	0	3	2	0	0	0
8	6	7	20	22	12	11	22
9	69	0	10	18	0	1	2
10	16	14	2	60	1	2	5
11	51	49	0	0	0	0	0

14. Chez *Neurospora,* le locus *a* est à 5 u.c. du centromère sur le chromosome 1. Le locus *b* est à 10 u.c. du centromère sur le chromosome 7. Dans un croisement $a\ b^+ \times a^+b$, déterminez les fréquences des produits suivants : a) les asques DP ; b) les asques DNP ; c) les asques tétratypes ; d) les ascospores recombinantes ; e) les ascospores de type sauvage.(REMARQUE : Ne vous embarrassez pas ici de complications du type fonction cartographique.)

15. Chez *Neurospora*, les produits de trois croisements sont analysés comme des tétrades non ordonnées. Chaque croisement fait intervenir une paire de gènes liés différents. Voici les résultats :

Croisement	Parents	Ditypes parentaux (%)	Tétratypes (%)	Ditypes non parentaux (%)
1	$a\ b^+ \times a^+\ b$	51	45	4
2	$c\ d^+ \times c^+\ d$	64	34	2
3	$e\ f^+ \times e^+\ f$	45	50	5

Pour chaque croisement, calculez :

a. La fréquence de recombinaison (FR).

b. La distance cartographique non corrigée basée sur FR.

c. La distance cartographique corrigée, basée sur les fréquences des tétrades.

16. Chez la levure, un généticien effectue un croisement faisant intervenir les gènes liés *ura3* (auxotrophie pour l'uracile) et *lys4* (auxotrophie pour la lysine) de la façon suivante :

ura3 lys4$^+ \times$ *ura3*$^+$ *lys4*

300 tétrades *non ordonnées* sont analysées et se répartissent comme suit :

ura3 lys4$^+$	*ura3 ys4*	*ura3 lys4*$^+$
ura3$^+$*lys4*	*ura3 lys4*	*ura3 lys4*$^+$
ura3 lys4	*ura3*$^+$*lys4*$^+$	*ura3*$^+$*lys4*
ura3$^+$*lys4*$^+$	*ura3*$^+$*lys4*$^+$	*ura3*$^+$*lys4*
138	12	150

a. Quelle est la fréquence de recombinaison ?

b. Si l'on suppose que zéro, un ou deux crossing-over (jamais plus) peuvent se produire entre ces loci à la méiose, quels seront les pourcentages de méioses à zéro, un ou deux crossing-over ?

c. Quelle est la distance entre les loci (en unités cartographiques) *corrigée* pour tenir compte des doubles crossing-over ?

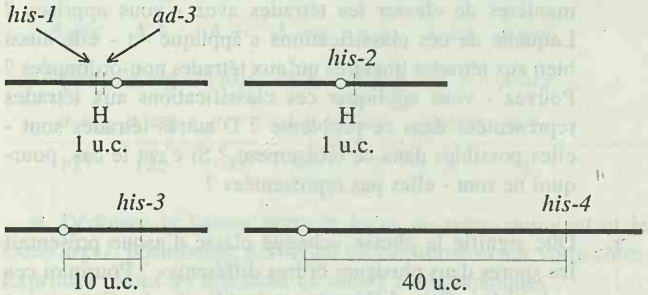
***17.** Dans une expérience avec des levures haploïdes, vous disposez de deux cultures. Chacune croît sur milieu minimum (des sels inorganiques plus du sucre) additionné d'arginine, mais aucune d'elles ne croît sur milieu minimum sans supplément nutritif. En suivant la procédure appropriée, vous induisez les cellules des deux cultures à se croiser. Les cellules diploïdes subissent alors la méiose et produisent des tétrades non ordonnées. Vous analysez un nombre élevé de ces tétrades et vous obtenez les résultats suivants :

Ségrégation de ARG$^-$: ARG$^+$	Fréquence (%)
4 : 0	40
3 : 1	20
2 : 2	40

a. En utilisant des symboles de votre choix, attribuez des génotypes aux cultures parentales. Pour chacun des modes de ségrégation, attribuez un génotype aux ségrégeants.

b. Si l'auxotrophie pour l'arginine résulte de mutations à plus d'un locus, ces loci sont-ils liés ?

***18.** On connaît quatre loci histidine chez *Neurospora*. Comme on le voit ici, les loci sont situés sur des chromosomes différents.



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dans votre expérience, au départ d'une culture *ad-3,* vous isolez une lignée de cellules qui exigent également l'histidine. Vous voulez alors savoir lequel des loci histidine est muté. Vous croisez la souche *ad-3 his- ?* avec une souche de type sauvage (*ad-3*$^+$ *his-1*$^+$ *his-2*$^+$ *his-3*$^+$ *his-4*$^+$) et vous analysez 10 tétrades comme des tétrades non ordonnées. : deux sont DP, six sont T et deux sont DNP. D'après ce résultat, lequel des quatre loci *his* a-t-il changé de *his*$^+$ à *his* ?

(Ce problème nous a été transmis par Luke de Lange).

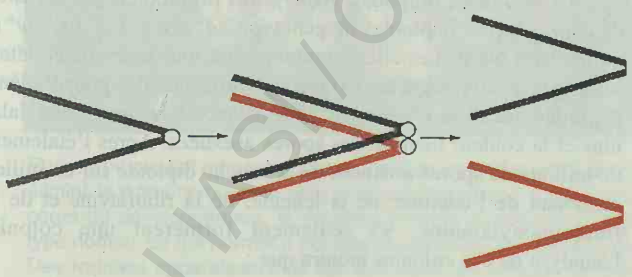
19. Chez le champignon ascomycète *Sordaria*, les ascospores sont normalement de couleur noire. Deux mutants de couleur des ascospores sont isolés. Quand on le croise avec un sauvage, le mutant 1 donne des asques qui contiennent quatre spores noires et quatre spores blanches, et le mutant 2 donne des asques qui contiennent quatre spores noires et quatre spores beiges. Quand les mutants 1 et 2 sont croisés entre eux, certains asques contiennent quatre spores noires et quatre spores blanches, d'autres contiennent quatre spores beiges et quatre blanches et d'autres encore contiennent quatre spores blanches, deux noires et deux beiges. Expliquez ces résultats en donnant

a. les génotypes responsables des trois phénotypes mutants ;

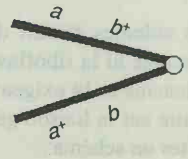
b. une explication des types d'asques produits dans les croisements avec le type sauvage et dans le croisement entre les mutants.

***20.** Chez *Drosophila melanogaster*, deux chromosomes X complets peuvent être attachés au même centromère.

Les deux bras se comportent à présent comme un seul chromosome appelé un X attaché. Décrivez le schéma héréditaire des chromosomes sexuels lors du croisement de femelles portant des X attachés avec des mâles normaux. A la méiose, l'exemplaire dupliqué du chromosome X ségrège de ses chromatides sœurs comme suit :



Des crossing-over peuvent avoir lieu entre chromatides non-sœurs de chromosomes X attachés. Supposez que vous ayez un chromosome X attaché de génotype suivant :



Faites un schéma de tous les génotypes possibles et des phénotypes correspondants produits par (a) des crossing-over simples entre *a* et *b* et entre *b* et le centromère ainsi que par (b) des échanges doubles entre *a* et *b* et entre *b* et le centromère. Assurez-vous d'avoir envisagé toutes les possibilités. Expliquez dans quelle mesure cette analyse est assimilable à une analyse de tétrades.

21. Chez *Neurospora,* le locus du signe conjugant où se trouvent les allèles *a* et *A* est à 5 u.c. du centromère sur le chromosome 1, et le locus de résistance à la cycloheximide, où se trouvent les allèles *c* et *C*, est à 8 u ;c ; du centromère sur le même chromosome. quelle proportion des tétrades *non ordonnées* provenant du croisement *A C* × *a c* sera -t - elle du type

a.	b.	**c.**
A c	*A C*	*a C*
A C	*A C*	*a C*
a c	*a c*	*A c*
a C	*a c*	*A c*

22. Un généticien a effectué un croisement chez le champignon *Sordaria*

un cyh × *un+cyh+*

et il a isolé 100 tétrades linéaires qui se répartissent en six classes dans les proportions suivantes :

1	2	3
un cyh	*un cyh*	*un cyh*
un$^+$*cyh*	*un cyh*$^+$	*un cyh*
un cyh$^+$	*un*$^+$*cyh*	*un*$^+$*cyh*$^+$
un$^+$*cyh*$^+$	*un*$^+$*cyh*$^+$	*un*$^+$*cyh*$^+$
15	29	47
4	5	6
un cyh	*un cyh*$^+$	*un cyh*
un$^+$*cyh*$^+$	*un*$^+$*cyh*	*un*$^+$*cyh*$^+$
un cyh	*un cyh*$^+$	*un cyh*$^+$
un$^+$*cyh*$^+$	*un*$^+$*cyh*	*un*$^+$*cyh*
2	2	5

a. Cartographiez les gènes l'un par rapport à l'autre et par rapport au centromère. Donnez les distances en unités non corrigées.

b. Dessinez six diagrammes de crossing-over, pour expliquer la formation de toutes les classes.

c. Quel type de tétrade manque -t - il et pourquoi ?

d. Pourquoi la classe 6 est - elle plus abondante que les classes 4 ou 5 ?

23. Le chromosome 4 de *Neurospora* porte le locus *leu3* à proximité du centromère ; ses allèles ségrègent toujours à la première division. Le locus *cys2* est sur l'autre bras du chromosome

BIU IAS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4, à 8 u.c. du centromère. Si nous croisons une souche *leu3*$^+$ *cys2* avec une souche *leu3 cys2*$^+$, et que nous ignorons les crossing-over doubles et autres multiples, qu'attendons-nous comme fréquences pour les sept classes de tétrades linéaires ci-dessous (l = *leu3*, c = *cys2*) ?

a. $l\ c$ / $l\ c$ / l^+c^+ / l^+c^+

b. $l\ c^+$ / $l\ c^+$ / l^+c / l^+c

c. $l\ c$ / $l\ c^+$ / l^+c^+ / l^+c

d. $l\ c$ / l^+c / l^+c^+ / $l\ c^+$

e. $l\ c$ / l^+c^+ / l^+c^+ / $l\ c$

f. $l\ c^+$ / l^+c / l^+c / $l\ c^+$

g. $l\ c^+$ / l^+c / l^+c^+ / $l\ c$

24. Considérons les trois allèles suivants chez *Drosophila* :

g code pour la couleur grise du corps (le type sauvage est noir)

c code pour des soies bouclées (les soies du type sauvage sont droites)

s code pour un corps tacheté (le corps du type sauvage est uni)

Ces loci autosomiques sont disposés dans l'ordre *g*–*c*–*s*–centromère. Une souche homozygote grise tachetée a été croisée avec une souche homozygote bouclée et la F1 avait dans son ensemble un phénotype sauvage,.mais un examen microscopique a montré que quelques (rares) mouches présentaient un des trois motifs suivants :

a. un secteur gris tacheté à côté d'un secteur bouclé

b. un secteur gris à côté d'un secteur bouclé

c. des secteurs gris isolés

Expliquez l'origine de ces trois motifs par une seule hyputhèse unificatrice.

25. Des expériences sur le champignon *Aspergillus* ont permis d'établir que les loci *ad, col, phe, pu, sm* et *w* sont sur le même chromosome, sans toutefois en déterminer l'ordre. Un diploïde de génotype *ad col phe pu sm w / ad*$^+$ *col*$^+$ *phe*$^+$ *pu*$^+$ *sm*$^+$ *w*$^+$ a été construit (les gènes sont écrits dans l'ordre alphabétique). Quand ce diploïde est mis en culture, on observe l'apparition de secteurs blancs diploïdes (*w w*) qu'on isole. En les analysant, on découvre qu'ils présentent les *phénotypes* suivants (aucun des secteurs blancs diploïdes n'exprime *col*) :

ad	*phe*	*pu*	*sm*	41%
ade	*phe*$^+$	*pu*	*sm*$^+$	30%
ad	*phe*$^+$	*pu*	*sm*	24%
ad$^+$	*phe*$^+$	*pu*	*sm*$^+$	5%

a. Quelle est l'origine probable de ces secteurs ?

b. Quel est l'ordre des gènes entre eux et par rapport au centromère ?

c. Donnez des distances cartographiques relatives là où c'est possible.

d. Pourquoi *col* n'est-il pas exprimé par les cellules blanches diploïdes ?

26. Chez le soya, un gène à dominance incomplète *Y*, détermine un aspect jaunâtre de la feuille. Quand des hétérozygotes «jaunâtres» *Y* + *Y* arrivent à maturité, certaines de leurs feuilles présentent de rares taches où une zone de tissu vert sombre (normal) avoisine une zone de tissu d'un jaune très pâle, le tout sur un fond jaunâtre. Proposez une explication à la présence de ces taches.

27. Une souche diploïde d'*Aspergillus* qui est *w*$^+$*w a*$^+$*a b*$^+$*b c*$^{+c}$ est rendue haploïde et de nombreux haploïdes blancs sont analysés pour déterminer le statut des loci *a, b* et *c*. Les résultats sont : 25 pour cent *w a b c*, 25 pour cent *wa*$^+$*b*$^+$*c*$^+$, 25 pour cent *w a b*$^+$*c* et 25 pour cent *w a*$^+$*b c*$^+$. Quelles relations de liaison entre ces loci pouvez-vous déduire de ces fréquences ? Dessinez un schéma pour étayer vos conclusions.

28. Chez une souche d'*Aspergillus* diploïde *y*$^+$*ribo*$^+$ */ y ribo*, ces deux loci sont liés, mais leur ordre par rapport au centromère n'est pas connu. On obtient des ségrégeants diploïdes jaunes dont 80 pour cent sont ribo$^+$ et 20 pour cent sont ribo auxotrophes. Quel est l'ordre le plus probable des marqueurs et du centromère ?

29. Un *Aspergillus* diploïde est *pro*$^+$ *pro fpa*$^+$ *fpa paba*$^+$ *paba*. *Pro* est un allèle récessif déterminant l'auxotrophie pour la proline, *fpa* est un allèle récessif causant la résistance à la fluorophénylalanine et *paba* est un allèle récessif provoquant l'auxotrophie pour l'acide para-aminobenzoïque (paba). En étalant des spores asexuées sur un milieu contenant de la fluorophénylalanine, on sélectionne des colonies résistantes. Sur 154 colonies résistantes *diploïdes*, 35 ne requièrent ni proline ni paba, 110 exigent le paba et 9 exigent les deux pour croître.

a. Que signifient ces chiffres ?

b. Présentez vos conclusions sous forme de carte.

c. Certaines colonies résistantes (pas celles décrites ici) sont haploïdes. Quelle prédiction feriez-vous quant à leur phénotype ?

30. Une souche diploïde d'*Aspergillus* fut produite par la fusion de deux souches haploïdes de génotype *ad*$^+$ *leu*$^+$ *ribo*$^+$ *fpa*$^+$ *w*$^+$ et *ad leu ribo fpa w*. Les allèles mutants sont tous récessifs et déterminent respectivement les exigences nutritionnelles pour l'adénine, la leucine et la riboflavine, la résistance à la fluorophénylalanine et la couleur blanche des spores asexuées. Après l'étalement de milliers de spores asexuées de la souche diploïde sur un milieu contenant de l'adénine, de la leucine, de la riboflavine et de la fluorophénylalanine, 93 seulement formèrent une colonie. L'analyse de ces colonies montra que :

a. 38 étaient haploïdes, dont 22 de génotype *fpa leu ribo ad*$^+$ *w*$^+$ et 16 de génotype *fpa leu ribo ad w*. Que nous apprend ce résultat sur la liaison des gènes en question ? Faites un schéma.

b. Les 55 autres colonies étaient diploïdes ; parmi elles, 24 n'exigeaient ni la leucine ni la riboflavine, 17 exigeaient la riboflavine mais pas la leucine et 14 exigeaient les deux. Quelle information supplémentaire sur la liaison génétique est - elle apportée par ce résultat ? Faites un schéma.

CHAPITRE

7

Les mutations géniques

Phénotype produit par une mutation instable chez *Zinnia*. La mutation élimine le pigment rouge, le tissu muté est donc blanc. Cependant, au cours du développement, la mutation réverse fréquemment vers le type normal, ce qui permet à nouveau la synthèse de pigment rouge. Des traînées apparaissent du fait que, dans les pétales, la division cellulaire se produit principalement dans le sens de la longueur, de sorte que les cellules dérivées des cellules révertantes tendent à se disposer longitudinalement. (D'après M.A.L. Smith, département d'horticulture, université de l'Illinois ; voir *Journal of Heredity*, 80, 1989).

CONCEPTS-CLÉS

- La mutation est le processus par lequel les gènes passent d'une forme allélique à une autre.
- Les mutations dans les cellules germinales peuvent être transmises à la descendance alors que les mutations somatiques ne le peuvent pas.
- Les mutations entraînent le plus souvent la perte d'une fonction plus rarement l'acquisition d'une nouvelle.
- Nombre de systèmes sélectifs spéciaux facilitent l'obtention de mutations.
- Les mutagènes sont des agents qui augmentent les fréquences, naturellement basses, d'apparition des mutations.
- Les mutations se produisent au hasard, n'importe quand et dans n'importe quelle cellule d'un organisme.
- Un processus biologique peut être disséqué génétiquement par l'isolement de mutations qui l'affectent. Les mutations permettent en effet d'identifier les gènes qui déterminent le processus.

UNIVERSITY LIBRARY

L'analyse génétique serait impossible sans **variants**, c'est-à-dire des organismes qui diffèrent par un caractère particulier. Nous avons décrit de nombreux exemples d'analyses génétiques, qui ont été effectuées sur des organismes chez lequels différents phénotypes se présentent pour un caractère particulier. Ici, nous considèrerons l'origine de ces variants. Comment apparaissent-ils ?

La réponse est simple : l'organisme a une tendance naturelle à passer d'un état héréditaire à un autre. Le processus est appelé **mutation**. On reconnaît deux niveaux où les mutations peuvent se produire.

Par **mutation génique** un gène peut passer d'une forme allélique à une autre. Comme le changement se produit dans un gène unique, donc à un locus précis, il est souvent appelé **mutation ponctuelle.** L'autre niveau est celui des **mutations chromosomiques :** des segments de chromosome, des chromosomes entiers, ou même des groupes de chromosomes, peuvent subir des altérations génétiques. Ce type d'altération héréditaire n'implique pas nécessairement de mutation génique. Les effets d'une mutation chromosomique sont plutôt dûs au nouvel arrangement des chromosomes et des gènes qu'ils contiennent. Certaines mutations chromosomiques, en particulier, celles qui impliquent des cassures de chromosomes peuvent cependant s'accompagner de mutations géniques dues aux effets immédiats des cassures elles-mêmes. Dans ce chapitre, nous explorerons les propriétés des mutations géniques ; aux chapitres 8 et 9, nous considèrerons les mutations chromosomiques.

Lorsqu'on parle de changement, il faut évidemment avoir un point de référence, un standard. En génétique, le standard est fourni par ce que l'on appelle le **type sauvage.** Celui-ci peut être soit une forme que l'on trouve dans la nature, soit une forme couramment utilisée comme standard en laboratoire. Tout changement qui provoque un écart par rapport au type sauvage s'appelle une mutation ; un changement qui provoque un retour au type sauvage s'appelle une **mutation réverse,** une **réversion** ou une **mutation en retour.** Par exemple :

$a^+ \longrightarrow a$
$D^+ \longrightarrow D$
} mutations

$a \longrightarrow a^+$
$D \longrightarrow D^+$
} réversions

Une forme non sauvage d'un gène peut aussi s'appeler une mutation. L'utilisation du même mot pour un processus et son produit pourrait prêter à confusion, mais, comme nous le verrons, dans la pratique c'est rarement le cas. Nous parlerons d'une mutation dominante (comme *D* ci-dessus), ou d'une mutation récessive (*a*). Souvenons-nous à quel point cette terminologie est arbitraire. Le type sauvage d'aujourd'hui pourrait avoir été une mutation lors d'un stade passé de son évolution, et vice-versa.

Un autre terme utile est **mutant.** Il s'agit d'un adjectif qui devrait donc toujours suivre un nom. Ce dernier est parfois omis. Le terme mutant se rapporte alors nécessairement à un individu ou à une cellule dont le phénotype révèle la présence d'une mutation.

Deux derniers termes importants sont **événement mutationnel,** désignant l'apparition proprement dite de la mutation, et **fréquence de mutation,** c'est-à-dire la proportion de mutations présentes dans une population de cellules ou d'individus.

Les mutations somatiques et germinales

Les mutations peuvent se produire, soit dans un tissu somatique, soit dans un tissu germinal et s'appellent respectivement mutations somatiques ou germinales. Elles sont schématisées dans la figure 7-1.

Mutation somatique

Une **mutation somatique,** c'est-à-dire une mutation dans un tissu somatique en développement, provoquera l'apparition d'une population de cellules mutantes identiques, qui toutes descendent de la cellule qui a subi la mutation initiale. Une population de cellules identiques qui dérivent d'une cellule mère par reproduction asexuée s'appelle un **clone.** Comme les membres d'un clone tendent à rester groupés, ils forment généralement des secteurs. Plus un événement mutationnel se produit tôt dans le développement, plus le clone sera important (figure 7-2). Si son phénotype contras-

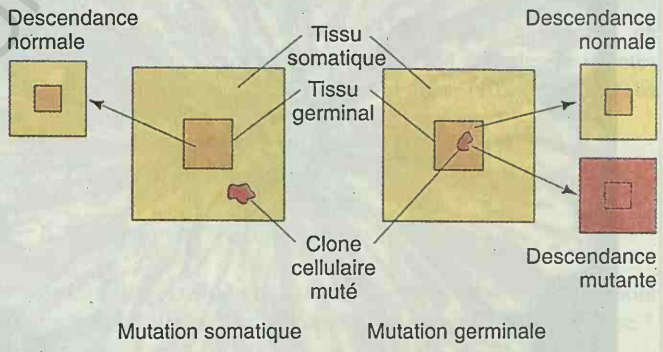


Figure 7-1. Les mutations somatiques ne sont pas transmises à la descendance, mais les mutations germinales peuvent l'être.

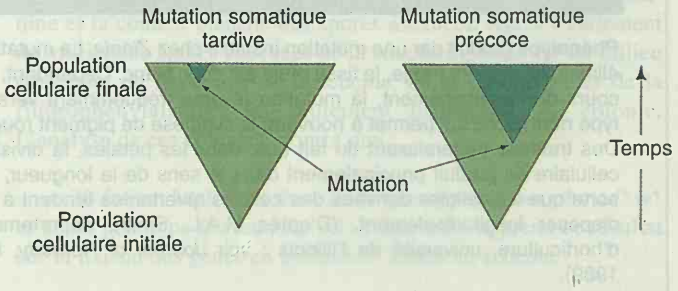


Figure 7-2. Dans une population en croissance, une mutation qui apparaît au début de la croissance produit un plus grand nombre de cellules mutantes qu'une mutation qui apparaît tard.

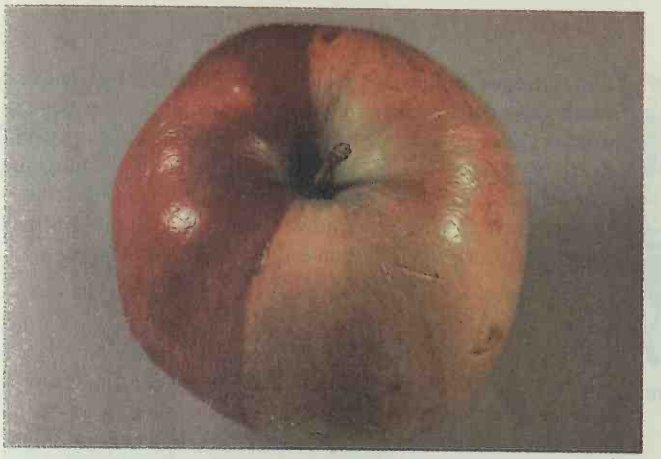


Figure 7-3. Mutation somatique chez la pomme «red delicious». L'allèle mutant qui détermine la couleur dorée (golden) est apparu dans une fleur, dans la paroi de l'ovaire, partie qui se développe en donnant la chair du fruit. Les graines elles-même n'ont donc pas muté et doivent donner des arbres à pommes rouges (noter qu'en fait, la variété golden delicious originale provient d'une branche mutante apparue sur un arbre du type red delicious). (Anthony Griffiths).

Figure 7-4. Roses blanches résultant d'une mutation dans la synthèse des pigments floraux. La mutation est apparue dans du tissu somatique mais a pu être transmise via les graines par la suite ; en l'occurrence elle est apparue dans un bourgeon de rameau latéral, qui s'est développé et a produit des fleurs. (Document de la Harper Horticultural Slide Library).

te avec celui des cellules sauvages qui l'entourent (figure 7-3), le secteur mutant peut être identifié à l'œil nu.

Chez les diploïdes, on s'attend à ce qu'une mutation dominante se manifeste dans le phénotype de la cellule ou du clone cellulaire qui la porte. Une mutation récessive, par contre, ne sera pas exprimée puisqu'elle est masquée par un allèle sauvage. Une deuxième mutation pourrait mener à la formation d'un homozygote exprimant le phénotype récessif mais ceci sera rare.

Quelles pourraient être les conséquences d'une mutation somatique dans la cellule d'un organisme différencié? Si la mutation survient dans un tissu dont les cellules se divisent encore, un clone muté peut se former. Si la mutation touche une cellule post-mitotique, qui ne se divise donc plus, son impact sur le phénotype sera probablement négligeable. Même lorsque une mutation dominante provoque une déficience voire la mort de la cellule, cette perte sera compensée par les autres cellules du tissu.

Il faut cependant noter le cas particulier des mutations qui provoquent le cancer. Celles-ci surviennent dans une catégorie de gènes dénommés **proto-oncogènes,** dont plusieurs contrôlent la division cellulaire. Ces mutations font entrer la cellule dans un cycle de multiplication non contrôlée ce qui provoque la formation d'un groupe de cellules appelé **tumeur.** Nous en verrons des exemples plus loin dans ce chapitre. Les mécanismes qui déclenchent le cancer seront analysés au chapitre 24.

Par définition, une mutation somatique ne peut pas se transmettre à la descendance. Cependant, notons que si un explant est récupéré à partir d'un tissu de plante contenant un clone mutant, la plante qui se développera à partir de cet explant aura des cellules germinales mutées et pourra, elle, transmettre la mutation à sa descendance. Dans ce cas, une mutation originellement apparue comme somatique peu finalement être transmise sexuellement. Une telle situation est représentée sur la figure 7-4.

Le système génétique utilisé pour identifier une mutation somatique devra nécessairement permettre d'éliminer la possibilité qu'un secteur résulte d'une ségrégation mitotique ou d'une recombinaison (chapitre 6). Si l'individu étudié est un diploïde homozygote, il est presque certain que le secteur observé résulte d'une mutation.

Mutation germinale

Les **mutations germinales** apparaissent dans un tissu qui se différenciera en cellules reproductrices. Si celles-ci prennent part à une fécondation, la mutation passera à la génération suivante. Un individu de phénotype en apparence tout à fait normal, et dont les ancêtres étaient normaux, peut porter des cellules reproductrices mutées. Celles-ci ne seront décelées que si elles participent à la formation d'un zygote (figures 7-5 et 7-6). Au chapitre 3 nous avons vu que la mutation liée au chromosome X et responsable de l'hémophilie affectant les familles royales européennes, trouve probablement son origine dans les cellules germinales de la reine Victoria ou d'un de ses parents. Cette mutation se manifesta uniquement chez ses descendants mâles.

Au niveau opérationnel, la mise en évidence d'une mutation germinale nécessite que l'on puisse éliminer la ségrégation méiotique ou la recombinaison comme en étant la cause.

Message Avant qu'une variation de l'état héréditaire puisse être attribuée à une mutation, il faut pouvoir s'assurer que ni la ségrégation ni la recombinaison ne sont à l'origine de cette variation. Ceci est valable pour les mutations somatiques comme pour les mutations germinales.

Figure 7-5. Mutation germinale responsable de l'apparition de pétales blancs chez la vipérine commune (*Echium vulgare*). Une mutation germinale récessive *a* s'est produite chez une plante à fleurs bleues (*AA*) de la génération précédente, donnant du tissu germinal *Aa*. Après autofécondation, la mutation fut transmise à la descendance, dont une partie avait ainsi acquis le génotype *aa* et exprimait le phénotype mutant. (Anthony Griffiths).

Figure 7-6. Une mutation au phénotype «oreilles recourbées» est apparue dans la lignée germinale d'un chat à oreilles normales (droites) et s'est exprimée dans la descendance, dont un individu est représenté ci-dessus. Cette mutation est survenue dans une population de chats de Lakewood (Californie) en 1981 ; elle est autosomique et dominante. (D'après R. Robinson, *Journal of Heredity* 80, 1989, 474).

Les types de mutants

Les conséquences phénotypiques d'une mutation peuvent être si subtiles que des techniques biochimiques sophistiquées deviennent nécessaires pour la mettre en évidence. Mais elles peuvent aussi être si sévères qu'elles produisent un défaut morphologique majeur ou même la mort. Ci-dessous, nous établissons une classification grossière, basée sur les moyens qui permettent d'identifier les mutations. Cette classification est loin d'être exhaustive.

Mutations morphologiques

«morph» signifie «forme». Les mutations de cette classe modifient les propriétés visibles d'un organisme, comme sa forme, sa couleur ou sa taille. Les ascospores albinos de *Neurospora,* les ailes recourbées de *Drosophila,* le nanisme des plants de pois, sont considérés comme des mutations morphologiques. Quelques exemples de telles mutations sont illustrés dans la figure 7-7.

Mutations létales

L'allèle nouveau se reconnaît à son effet létal sur l'organisme. Parfois la cause primaire de la mort est facile à identifier (comme, par exemple, certaines anomalies sanguines). Mais parfois le gène muté ne se reconnaît qu'à son effet sur la viabilité. Un exemple est illustré par la figure 7-8.

Mutations conditionnelles

Les allèles mutants de cette classe n'expriment leur phénotype que dans certaines conditions appelées **restrictives.** Ils expriment un phénotype normal dans d'autres conditions dites **permissives.** Dans cette classe, les mutants thermosensibles ont été très utilisés. Une classe de mutants de *Drosophila,* par exemple, est connue sous le nom de «létaux thermosensibles dominants». Les hétérozygotes de cette classe (disons, H^+ / H) sont normaux à 20°C, température permissive, mais meurent lorsque la température s'élève à 30° C, température restrictive.

Nombre d'organismes mutants sont moins vigoureux que leur homologue normal et peuvent donc se révéler des sujets d'expérience difficiles. De ce fait, les mutants conditionnels sont très pratiques à utiliser puisqu'il est possible de les faire croître en conditions permissives, et de passer ensuite en conditions restrictives pour étudier l'effet de la mutation. Un autre avantage de ce type de mutation est la possibilité de définir la **période de sensibilité à la température**, ce qui peut fournir des indices sur le mode et le temps d'action du gène.

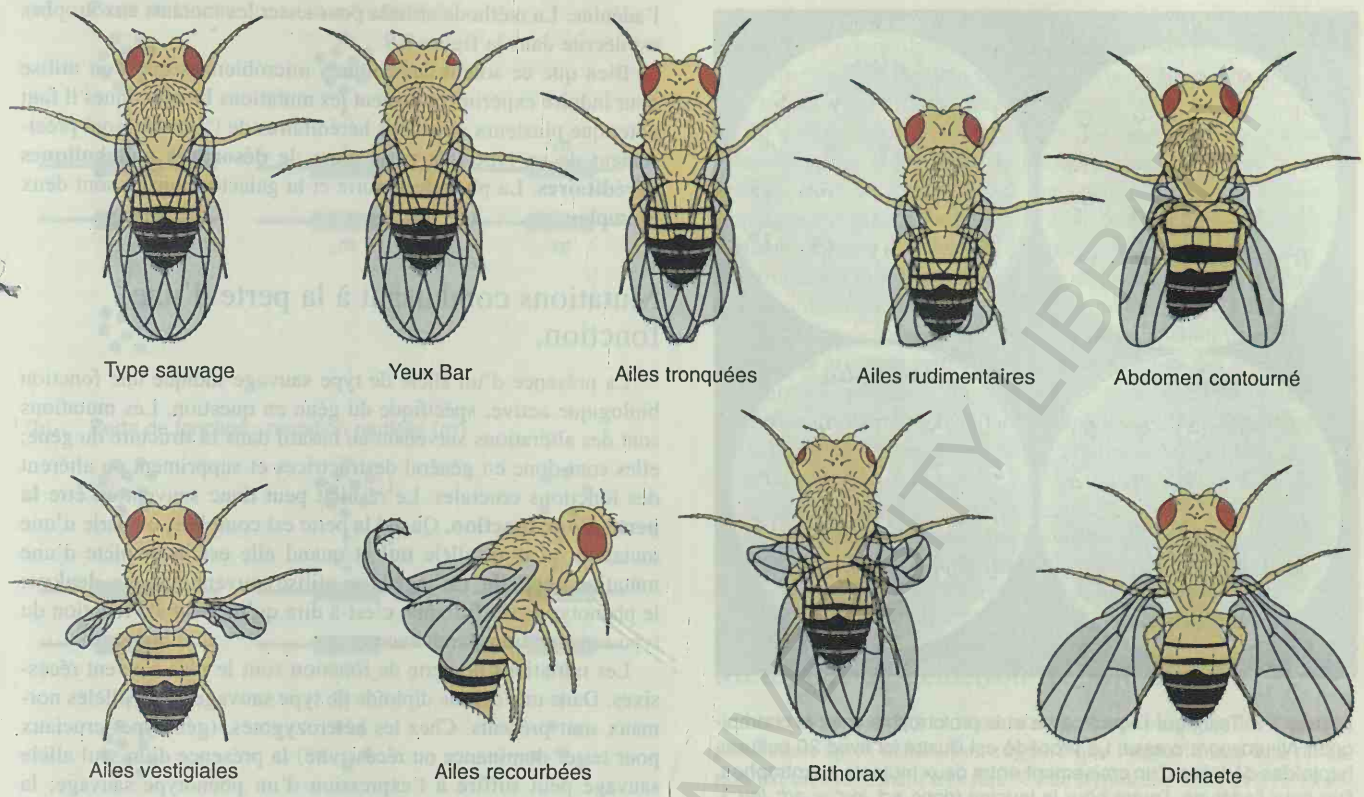
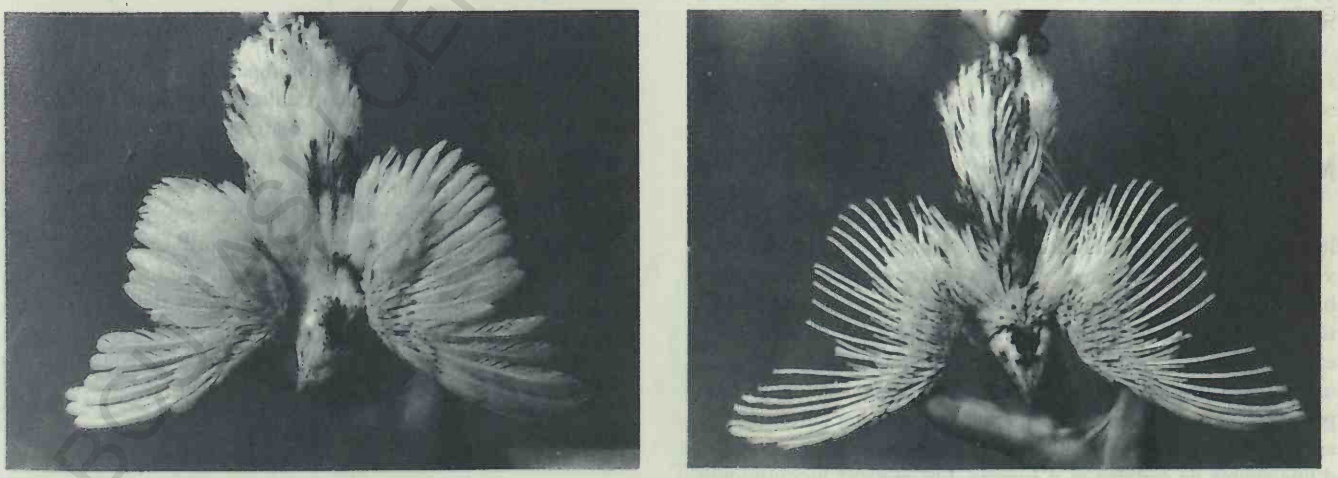


Figure 7-7. Huit mutants morphologiques de *Drosophila*. La plupart des appellations phénotypiques se passent d'explication ; bithorax est une anomalie du thorax où une paire de petites ailes remplace les haltères ; le trait le plus apparent du mutant fendu (dichaete) est le port anormal des ailes à 45 degrés du corps. Ce sont les termes anglais qui sont habituellement utilisés dans la littérature internationale.



(a) (b)

Figure 7-8. Plumage d'une caille japonaise. (a) Phénotype normal, (b) un mutant rare apparu spontanément dans une population élevée au laboratoire. La mutation est donc apparue en captivité et a été maintenue comme sujet d'analyse. Dans la nature elle se serait probablement avérée létale. (Avec l'aimable autorisation de Janet Fulton.)

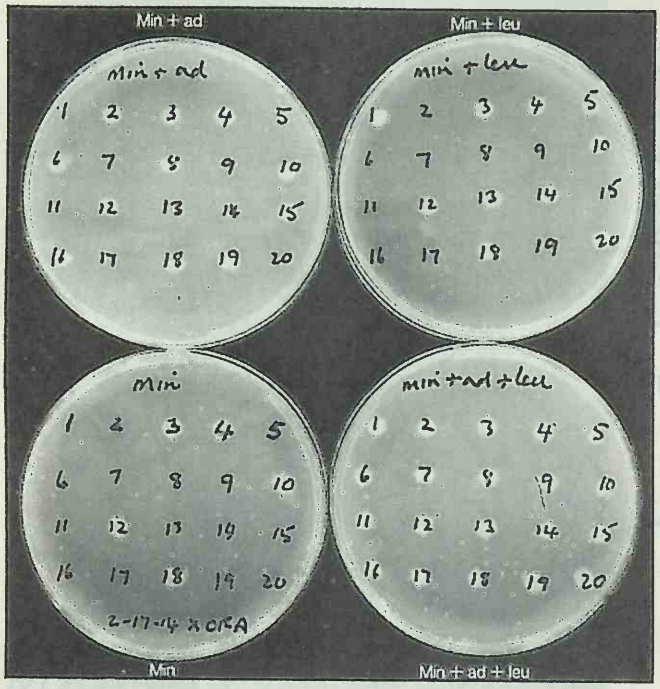


Figure 7-9. Test pour l'auxotrophie et la prototrophie chez le champignon *Neurospora crassa*. Le procédé est illustré ici avec 20 cultures haploïdes dérivées d'un croisement entre deux mutants auxotrophes, l'un pour l'adénine, l'autre pour la leucine (donc *ad*$^-$ *leu*$^+$ × *ad*$^+$ *leu*$^-$). Les cultures sont testées en plongeant une aiguille stérile dans un tube de culture pour ensemencer ensuite 4 boîtes contenant chacune un milieu gélosé différent. Ceux-ci contiennent différentes combinaisons d'adénine et de leucine, sur lesquelles différents génotypes se comportent différemment.Les milieux sont respectivement : minimal plus adénine (en haut à gauche), plus leucine (en haut à droite), sans adénine ni leucine (en bas à gauche) ou plus adénine et leucine (en bas à droite). La croissance se manifeste par des colonies circulaires (blanches sur la photo). Toute culture croissant sur milieu minimal doit être *ad*$^+$*leu*$^+$, sur adénine sans leucine *leu*$^+$, et sur leucine sans adénine *ad*$^+$. Toutes doivent croître sur adénine plus leucine, ce qui permet de contrôler leur viabilité. Comme exemples, la culture 8 doit être *ad*$^+$*leu*$^+$, 9*adleu*, 10 *ade*$^+$*leu*$^+$ et 13 *ade*$^+$*leu*. (Anthony Griffiths).

Mutations biochimiques.

Les mutations de cette classe se recrutent surtout chez les cellules en culture où l'altération d'une fonction biochimique provoque un arrêt de croissance. Souvent la croissance peut être rétablie par l'addition dans le milieu de culture d'une substance nutritive particulière. Les mutants biochimiques ont été abondamment exploités chez les micro-organismes. De nombreux micro-organismes sont **prototrophes,** c'est-à-dire qu'ils sont autonomes du point de vue nutritionnel et qu'ils peuvent subsister sur un milieu appelé **milieu minimum,** composé de simples sels inorganiques et d'une source de carbone et d'énergie. Les mutants biochimiques par contre sont souvent **auxotrophes** : pour pousser ils requièrent un milieu contenant une substance déterminée. Une certaine classe de mutants biochimiques de champignons, par exemple, ne peut pousser qu'en présence d'adénine, un composé cellulaire essentiel. Les mutants auxotrophes sont appelés *ad* ou auxotrophes pour l'adénine. La méthode utilisée pour tester les mutants auxotrophes est décrite dans la figure 7-9.

Bien que ce soient des cultures microbiennes que l'on utilise pour induire expérimentalement les mutations biochimiques il faut nôter que plusieurs affections héréditaires de l'Homme sont précisément de ce type. On parle alors de **désordres métaboliques héréditaires.** La phénylcétonurie et la galactosémie en sont deux exemples.

Mutations conduisant à la perte d'une fonction.

La présence d'un allèle de type sauvage indique une fonction biologique active, spécifique du gène en question. Les mutations sont des altérations survenant au hasard dans la structure du gène; elles sont donc en général destructrices et suppriment ou altèrent des fonctions cruciales. Le résultat peut donc souvent en être **la perte d'une fonction.** Quand la perte est complète, on parle d'une mutation ou d'un allèle **nul** et quand elle est incomplète d'une mutation **partielle.** En anglais on utilise souvent le terme **«leaky»**: le phénotype est «filtrant», c'est-à dire qu'un reste de fonction du type sauvage transparaît encore.

Les mutations de perte de fonction sont le plus souvent récessives. Dans une cellule diploïde de type sauvage, deux allèles normaux sont présents. Chez les hétérozygotes, (génotypes cruciaux pour tester dominance ou récessivité) la présence d'un seul allèle sauvage peut suffire à l'expression d'un phénotype sauvage; la mutation est alors pleinement récessive. Dans certains cas la cellule peut même stimuler l'activité du seul allèle sauvage et la porter à un niveau tel que la quantité de produit normal soit supérieure à la moitié de celle que l'on observe chez un homozygote de type sauvage. Il existe cependant des mutations de perte de fonction qui sont dominantes: dans ce cas-là le seul allèle sauvage présent chez l'hétérozygote ne fournit pas assez de produit normal pour assurer un phénotype sauvage. L'effet de mutations conduisant à des pertes de fonction est représenté de manière schématique dans les figures 7-10 a et b.

Mutations conduisant au gain d'une fonction.

L'effet des mutations peut être comparé à celui de balles que l'on tirerait au hasard dans une machine complexe: la plupart du temps le résultat sera négatif. Parfois cependant, il peut se faire que la balle touche la machine de telle manière qu'elle manifeste une fonction nouvelle. Ainsi peut-il en être de certaines mutations; parfois et par hasard, une mutation confère au gène une nouvelle fonction. Chez un hétérozygote celle-ci s'exprimera et se manifestera très probablement de manière dominante par un nouveau phénotype. Cette éventualité est représentée dans la figure 10 c.

Comment se manifestent les mutations

Le processus de mutation (ou mutagénèse) se déroule depuis que la vie existe sur notre planète. Ce seul fait le rend intéressant à étudier. En outre, les allèles mutants, tels que ceux dont nous venons de parler, sont extrêmement importants pour étudier les mécanismes mêmes de la mutagénèse. Ils nous permettent par

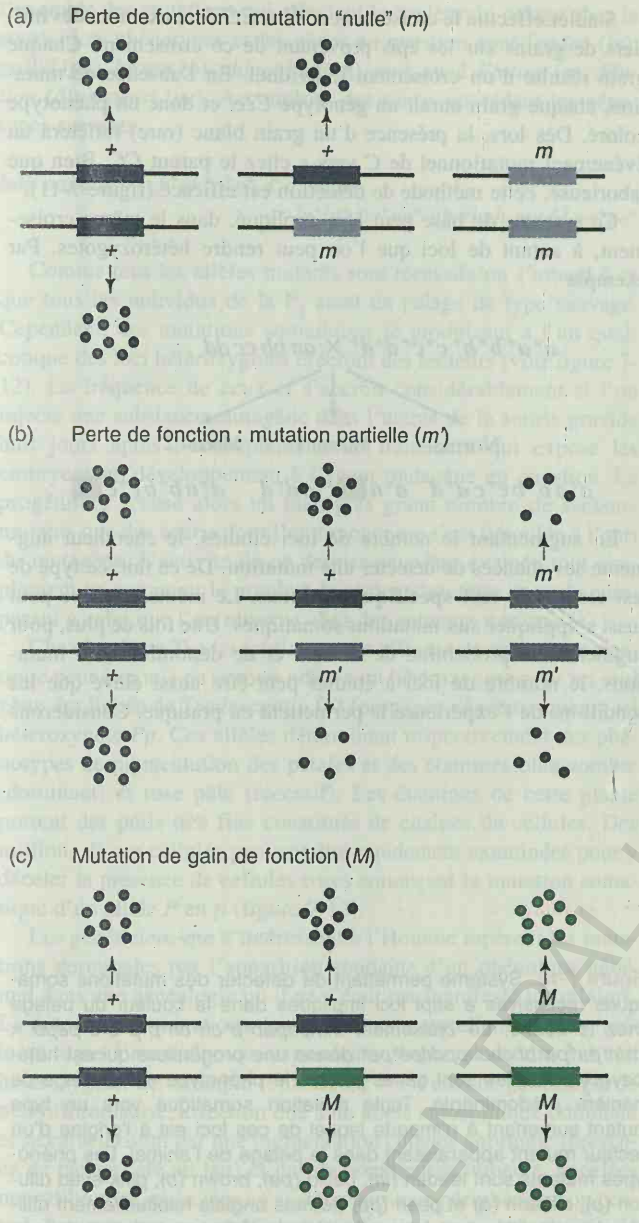


Figure 7-10. (a) La mutation *m* résulte en une perte de fonction complète (allèle nul). Chez l'hétérozygote le produit de type sauvage est encore synthétisé et ceci suffit souvent à produire un phénotype sauvage; dans ce cas *m* est récessif. Si le produit sauvage est en quantité insuffisante la mutation sera perçue comme dominante.(b) La mutation *m* conserve une certaine fonction mais dans l'homozygote le niveau n'est pas suffisant pour donner un phénotype sauvage. (c) La mutation *M* a déterminé l'acquisition d'une nouvelle fonction cellulaire représentée par le produit coloré en vert. *M* sera exprimé dans l'hétérozygote et sera très probablement dominant. Le mutant homozygote sera viable ou non, d'après le rôle de l'allèle *+*.

exemple de mesurer des fréquences de mutation. Ils sont alors considérés comme des marqueurs génétiques ou des gènes représentatifs ; dans ce cas, leur fonction précise importe peu puisqu'ils sont uniquement utilisés comme traceurs.

En génétique moderne cependant, les gènes mutants jouent un autre rôle pour lequel il est important de connaître leur fonction précise. Nous avons déjà noté (au chapitre 2) que la dissection génétique est une méthode établie d'analyse biologique. Les gènes mutants peuvent être utilisés comme sondes, pour disséquer les constituants d'une fonction biologique, leurs mécanismes d'action et leurs interconnexions. Le biologiste qui étudie une fonction particulière sera donc heureux d'avoir à sa disposition un maximum de mutants affectant cette fonction. Il en a résulté des «chasses aux mutations», préludes importants à toute analyse génétique. Identifier un variant génétique revient à identifier un composant d'un processus biologique. Nous continuerons d'illustrer cette idée, au cours de ce chapitre.

Message Les mutations peuvent être utilisées à deux fins: pour étudier les mécanismes de la mutagénèse et pour disséquer génétiquement les fonctions biologiques.

Méthodes de détection des mutations

L'extrême stabilité et la constance morphologique des espèces, génération après génération, suggère que l'apparition d'une mutation est un événement très rare. Cette hypothèse s'est avérée exacte; elle pose un problème au généticien qui désire détecter des mutations.

La première condition à remplir par une méthode de détection est de permettre à l'allèle mutant de se manifester par un phénotype. De cette manière, une mutation, même rare, n'échappera pas à la détection.

La dominance prend ici une importance considérable. Le système doit être conçu de telle sorte qu'une mutation récessive ne soit pas masquée par l'allèle sauvage de la paire. Une mutation dominante, elle, ne pose pas de problème. Prenons comme exemple l'un des premiers systèmes utilisés, celui de Lewis Stadler (ca 1920), destiné à l'étude de mutations affectant la couleur des grains de maïs ; le phénotype de l'allèle *C* correspond à des grains colorés, celui de l'allèle mutant *c* à des grains incolores. C'est le phénotype de l'endosperme de la graine que l'on observe. En retournant à la figure 3-38, nous voyons que ce tissu est formé par la fusion de deux noyaux femelles identiques avec un noyau haploïde mâle de pollen. Donc, le tissu possède trois garnitures chromosomiques ($3n$). La présence d'un seul allèle *C* combiné à deux allèles *c* suffit à déterminer un grain coloré.

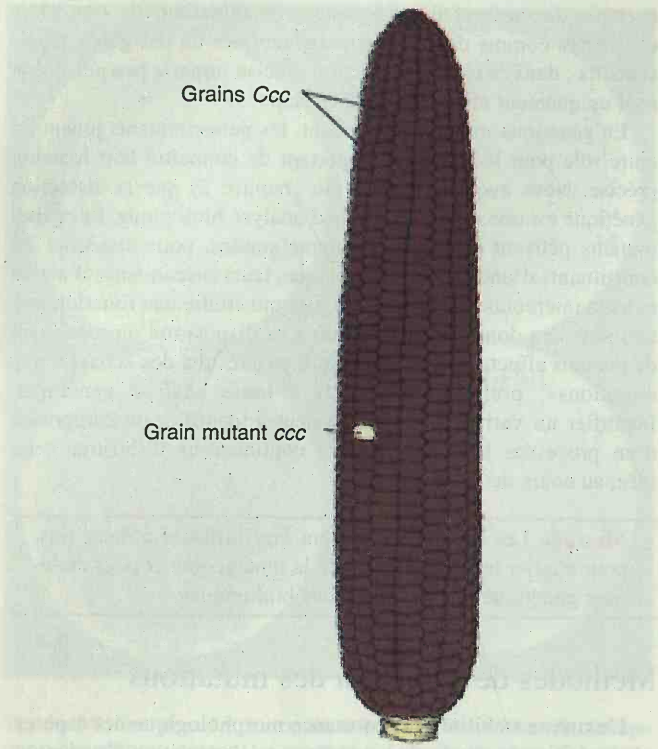


Figure 7-11. Système permettant de détecter des mutations à un locus donné chez le maïs. L'allèle *C* détermine la coloration pourpre des grains, *c* l'absence de pigmentation. Le généticien fait un croisement *cc*♀ × *CC*♂, et la mutation *C* → *c* dans la lignée germinale mâle se manifeste par l'apparition d'un grain non coloré sur l'épis.

Stadler effectua le croisement *cc* ♀ × *CC* ♂ et examina des milliers de grains sur les épis provenant de ce croisement. Chaque grain résulte d'un croisement individuel. En l'absence de mutation, chaque grain aurait un génotype *Ccc*, et donc un phénotype coloré. Dès lors, la présence d'un grain blanc (rare) reflètera un événement mutationnel de *C* vers *c* chez le parent *CC*. Bien que laborieuse, cette méthode de détection est efficace (figure 7-11).

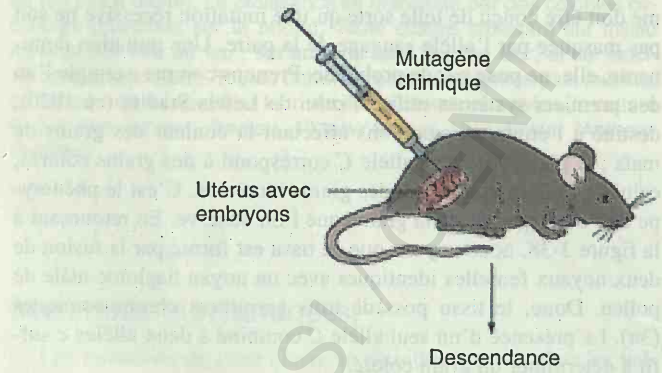
Ce système de base peut être appliqué, dans le même croisement, à autant de loci que l'on peut rendre hétérozygotes. Par exemple :

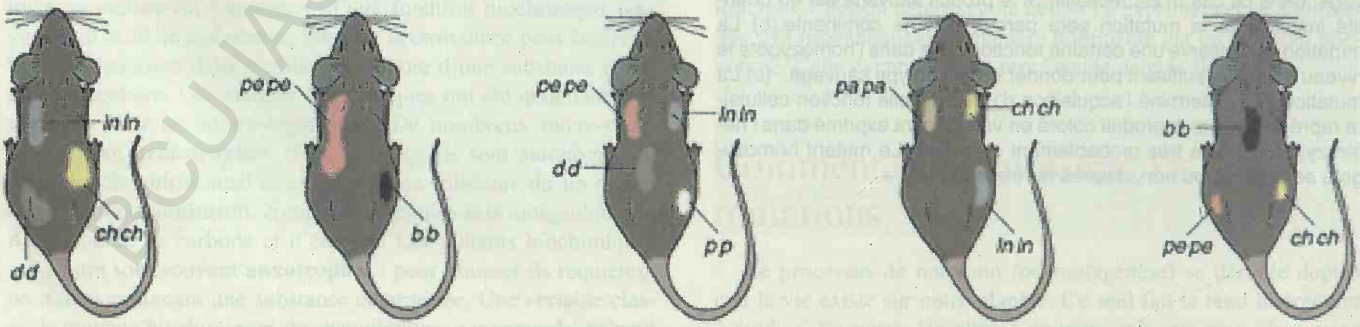
$$a^+a^+\,b^+b^+\,c^+c^+\,d^+d^+ \times aa\,bb\,cc\,dd$$

Normal — Mutant 1 — Mutant 2

$$a^+a\,b^+b\,c^+c\,d^+d \qquad a^+a\,bb\,c^+c\,d^+d \qquad a^+a\,b^+b\,c^+c\,dd$$

En augmentant le nombre de loci étudiés, le chercheur augmente ses chances de détecter une mutation. De ce fait, ce type de test est appelé **test spécifique de locus.** Le même principe peut aussi s'appliquer aux mutations somatiques. Une fois de plus, pour augmenter la probabilité de trouver et de dénombrer des mutations, le nombre de loci à étudier peut-être aussi élevé que les conditions de l'expérience le permettent en pratique. Considérons





Le génotype de la descendance est *lnln*⁺ *papa*⁺ *bb*⁺ *chch*⁺ *pp*⁺ *dd*⁺ *pepe*⁺
Le phénotype est sauvage avec des secteurs mutants

Figure 7-12. Système permettant de détecter des mutations somatiques récessives à sept loci impliqués dans la couleur du pelage chez la souris. Le croisement *lnlnpapabbchchppddpepe* × *lnlnpapabbchchppddpepe* donne une progéniture qui est hétérozygote pour les sept gènes et dont le phénotype est sauvage de manière prédominante. Toute mutation somatique vers un type mutant survenant à n'importe lequel de ces loci est à l'origine d'un secteur mutant apparaissant dans le pelage de l'animal. Les phénotypes mutants sont leaden (*ln*), pallid (*pa*), brown (*b*), pink-eyed dilution (*p*), dilution (*d*) et pearl (*pe*) (termes anglais habituellement utilisés dans la littérature internationale). La fréquence des mutations peut être augmentée si l'on administre une substance mutagène aux embryons.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

l'exemple des mutations qui affectent la couleur du pelage chez la souris. Les phénotypes et les gènes en question sont *leaden* (*ln*), *pallid* (*pa*), *brown* (*b*), *chinchilla* (*ch*), *pink-eyed dilution* (*p*), *dilution* (*d*) et *pearl* (*pe*). Accouplons des souris possédant les génotypes suivants :

lnln papa b^+b^+ $ch^+ch^+p^+p^+$ d^+d^+ *pepe*
× ln^+ln^+ pa^+pa^+ *bb chch pp dd* pe^+pe^+

Comme tous les allèles mutants sont récessifs on s'attend à ce que tous les individus de la F_1 aient un pelage de type sauvage. Cependant, des mutations somatiques se produisant à l'un quelconque des loci hétérozygotes créeront des secteurs (voir figure 7-12). La fréquence de ceux-ci s'accroît considérablement si l'on injecte une substance mutagène dans l'utérus de la souris gravide huit jours après l'accouplement, un traitement qui expose les embryons en développement à l'agent mutagène en question. La progéniture accuse alors un bien plus grand nombre de secteurs mutants que des souris dont l'embryogénèse s'est déroulée à l'abri du mutagène. L'activité de ce dernier peut-être évaluée tout simplement en comptant le nombre de secteurs mutants et en le comparant à celui que l'on observe chez des animaux non traités.

Chez la plante *Tradescantia*, un test efficace de mutation somatique peut être mis en oeuvre grâce à un hétérozygote pour un seul gène. La lignée de *Tradescantia* O2 (propagée végétativement) est hétérozygote *Pp*. Ces allèles déterminent respectivement des phénotypes de pigmentation des pétales et des étamines bleu sombre (dominant) et rose pâle (récessif). Les étamines de cette plante portent des poils très fins constitués de chaînes de cellules. Des millions de ces cellules peuvent être rapidement examinées pour y déceler la présence de cellules roses annonçant la mutation somatique d'un allèle *P* en *p* (figure 7-13).

Les généticiens qui s'intéressent à l'Homme repèrent les mutations germinales par l'apparition soudaine d'un phénotype anormal dans une généalogie où il ne s'était pas manifesté jusqu'alors. La détection de mutations dominantes est naturellement plus facile puisque l'anomalie correspondante s'observe même à l'état hétérozygote. Un exemple (voir figure 7-14) est une généalogie de neurofibromatose, affection due à un allèle autosomique dominant et se caractérisant par une pigmentation cutanée anormale (présence de taches café au lait) et par de nombreuses tumeurs, appelées neurofibromes, associées au système nerveux périphérique ou central. Les tumeurs se manifestent sur la peau comme le montre la figure. La généalogie révèle un passé vierge de neurofibromatose, l'affection survenant soudainement parmi les enfants d'un couple de la génération IV. La mutation doit s'être produite dans le tissu germinal de la mère ou du père. Il se fait que les fréquences de mutations causant soit la neurofibromatose soit l'achondroplasie sont fort élevées chez l'Homme, c'est donc une mutation qui est la cause de l'affection dans une proportion importante des cas. A l'inverse, la fréquence de la mutation causant la maladie de Huntington est très basse, de sorte que la plupart des personnes affectées ont hérité cette affection de générations antérieures. De fait, l'origine de la plupart des cas de maladie de Huntington répertoriés en Amérique du Nord a pu être circonscrite à deux familles d'immigrants.

Une mutation humaine récessive est plus difficile à mettre en évidence puisqu'elle n'est pas exprimée à l'état hétérozygote et peut passer inaperçue pendant des générations. Les mutations récessives liées au chromosome X peuvent se repérer plus facilement que des mutations autosomiques. Nous avons déjà fait allusion à la mutation qui provoque l'hémophilie dans les familles

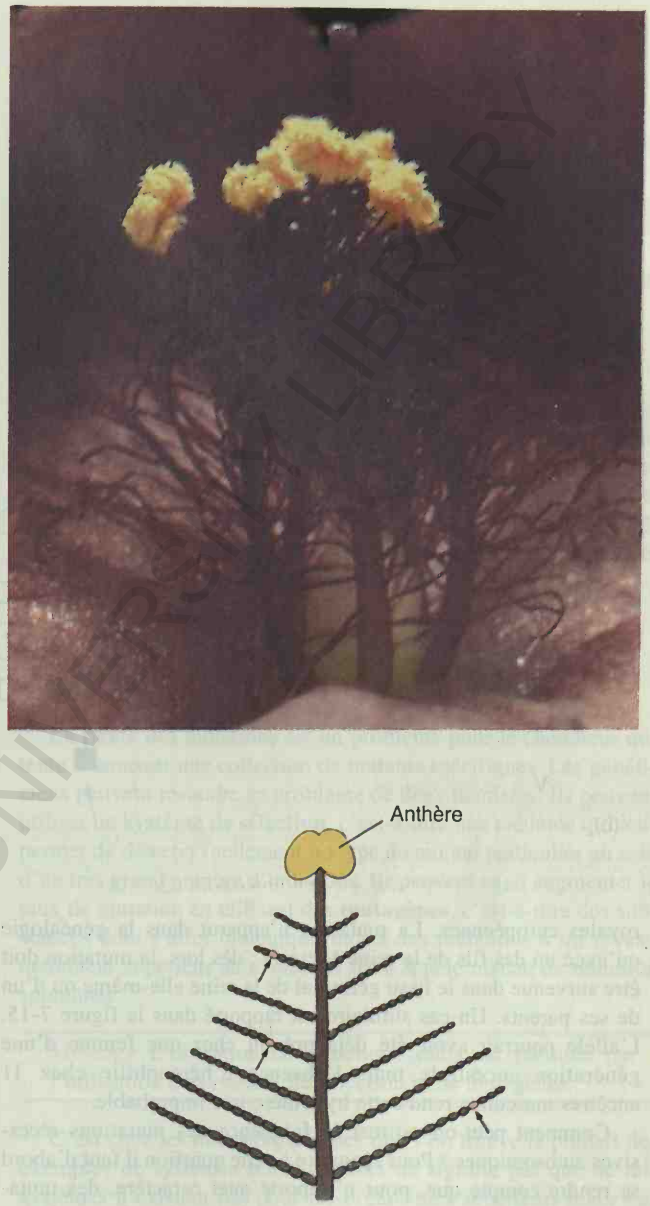


Figure 7-13. (a) Etamines de *Tradescantia* hétérozygotes pour les allèles *P* (bleu) et *p* (rose). (b) Dans les files de cellules qui constituent les poils latéraux, quelques cellules (marquées par une flèche) sont mutantes. Les parties ombrées correspondent à la couleur bleue (*P*), l'absence d'ombre à la couleur blanche (*pp*). (Partie a d'après Runk/Schoenberger/Grant Heilman).

(a)

(b)

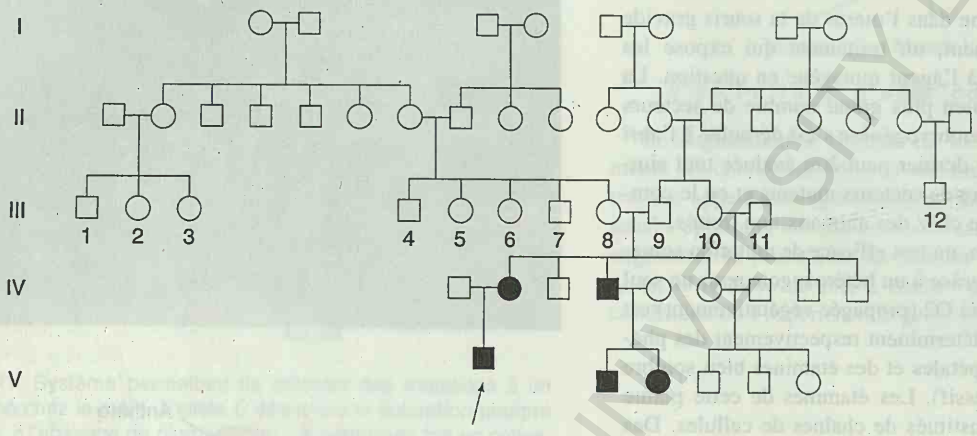


Figure 7-14. Mutation responsable de la neurofibromatose. (a) Neurofibromes. (b) Généalogie montrant que la mutation doit s'être produite dans la lignée germinale de III8 ou III9. (Partie a d'après Michael English/Custom Medical Stock).

royales européennes. La mutation n'apparut dans la généalogie qu'avec un des fils de la reine Victoria ; dès lors, la mutation doit être survenue dans le tissu germinal de la reine elle-même où d'un de ses parents. Un cas similaire est rapporté dans la figure 7-15. L'allèle pourrait avoir été déjà présent chez une femme d'une génération ancestrale mais l'absence d'hémophilie chez 11 ancêtres masculins rend cette hypothèse très improbable.

Comment peut-on estimer la fréquence des mutations récessives autosomiques ? Pour répondre à cette question il faut d'abord se rendre compte que, pour n'importe quel caractère, des mutations se produisent en permanence, s'insinuant dans la population comme les gouttes tombant d'un robinet mal fermé dans un récipient. Par contre elles disparaissent de la population par mutation réverse et par sélection, qui se comportent comme des fuites au récipient. Ces deux tendances opposées atteignent un équilibre, ce qui permet de calculer la fréquence de mutation ainsi que nous le verrons dans le chapitre consacré à la génétique des populations.

Les organismes haploïdes présentent un grand avantage sur les diploïdes pour l'étude des mutations. Le système de détection des mutations à l'état haploïde est fort simple : l'apparition d'un allèle mutant se manifeste directement et ne peut être masquée par un allèle dominant puisque celui-ci est absent. Dans certains cas, le mutant peut être identifié directement. Chez *Neurospora* par exemple, des mutants auxotrophes pour l'adénine ont été localisés dans différents loci. L'un d'entre eux, *ad-3,* se caractérise par le fait que les mutants accumulent un pigment rougeâtre dans leurs cellules lorsqu'ils poussent sur un milieu contenant de l'adénine à faible concentration. De tels mutants auxotrophes peuvent être identifiés en faisant germer, sur un milieu contenant peu d'adénine, des spores asexuées qui se développeront en colonies. Les colonies rouges se voient facilement parmi les colonies blanches

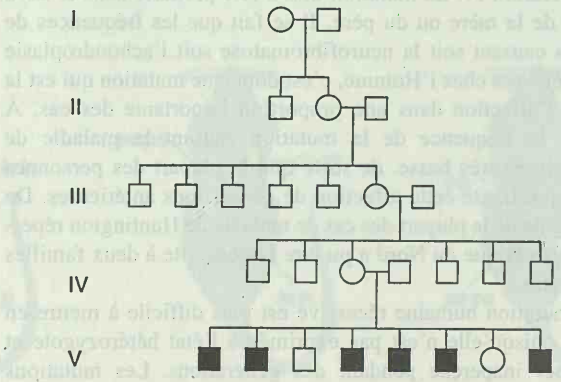


Figure 7-15. Mutation responsable d'une hémophilie récessive et liée au chromosome X.

de type sauvage.

Qu'en est-il d'autres auxotrophes ? Généralement, il n'y a pas d'effet pléiotrope visible comme c'est le cas pour les *ad-3*. Plus loin, nous analyserons la technique de détection de mutants auxotrophes la plus utilisée, la réplique sur tampon de velours.

A quelle fréquence les mutations apparaissent-elles ?

S'il possède un système de détection, le chercheur peut s'attaquer à la recherche de mutants. Il se rendra compte rapidement que les mutations sont rares, comme cela se voit dans le tableau 7-1. Ce tableau présente des résultats obtenus par Stadler lorsqu'il travaillait sur plusieurs loci du maïs. Les études de ce type représentent un travail énorme. Compter un million de quoi que ce soit n'est pas une mince affaire ! Le tableau montre également que différents gènes semblent muter à des fréquences différentes ; les résultats sur le maïs montrent une variation d'un facteur 500 d'un gène à l'autre. L'un des facteurs primordiaux de l'analyse des mutations est donc de pouvoir mesurer la tendance de différents gènes à muter. Deux types de mesure sont généralement utilisées à cette fin : la fréquence de mutation, que nous avons déjà rencontrée, et le taux de mutation.

Le **taux de mutation** est une évaluation de la probabilité qu'un événement mutationnel spécifique se produise en un laps de temps donné. On veut ici mesurer la tendance intrinsèque d'un gène à muter. Le temps peut être mesuré en différentes unités. A la place des unités de temps classiques, comme l'heure et le jour, on peut utiliser une unité caractéristique de l'organisme ou de la cellule étudiée, comme le temps de génération.

Considérons le pedigree de la figure 7-16. Un seul événement mutationnel (M) s'y est produit, ce qui nous donne le numérateur du rapport qui définira le taux de mutation. Le dénominateur devra apporter l'élément temps ; celui-ci sera, soit le nombre total de traits de la figure 7-16 (c'est-à-dire 14, représentant l'apparition d'autant de nouveaux individus), soit le nombre réel de divisions cellulaires (7). L'un ou l'autre est acceptable à condition que le choix soit explicite (par exemple, un événement mutationnel pour 7 divisions cellulaires).

La **fréquence de mutation** est la fréquence à laquelle on

TABLEAU 7-1. Fréquence de mutation à certains loci particuliers du maïs

Gène	Nombre de gamètes testés	Nombre de mutations	mutations par million de gamètes
R → *r*	554.786	273	492,0
I → *i*	265.391	28	106,0
Pr → *pr*	647.102	7	11,0
Su → *su*	1.678.736	4	2,4
Y → *y*	1.745.280	4	2,2
Sh → *sh*	2.469.285	3	1,2
Wx → *wx*	1.503.744	0	0,0

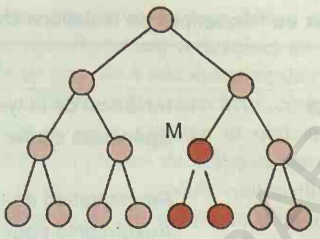


Figure 7-16. Un pedigree cellulaire simple, montrant l'apparition d'une mutation en M.

retrouve un type spécifique de mutations (ou de mutants) dans une population de cellules ou d'individus. La population cellulaire peut être formée de gamètes, de spores asexuées ou de n'importe quel type de cellules. Reprenons l'exemple de la figure 7-16 : la fréquence relative des mutants dans la population finale de 8 cellules est 2/8 = 0,25. Le tableau 7-2 donne la fréquence et le taux de certaines mutations dans différents organismes.

Systèmes de sélection

La rareté des mutations est un problème pour le chercheur qui tente d'amasser une collection de mutants spécifiques. Les généticiens peuvent résoudre ce problème de deux manières. Ils peuvent utiliser un **système de sélection**, c'est-à-dire une méthode qui leur permet de détecter facilement un type de mutant particulier au sein d'un très grand nombre d'individus. Ils peuvent aussi augmenter le taux de mutation en utilisant des **mutagènes**, c'est-à-dire des substances dont l'effet biologique induit des mutations à un niveau nettement supérieur au niveau de base appelé niveau de mutation spontanée.

Message L'obtention de mutations rares est facilitée par l'utilisation de systèmes de sélection et de mutagènes.

C'est chez les micro-organismes que l'on trouve la plupart des exemples de systèmes sélectifs. Ceci ne signifie pas que de tels systèmes n'existent pas pour les organismes supérieurs mais leur mise en œuvre n'y est cependant pas aussi simple que chez les microbes. On peut facilement produire un million de spores ou de bactéries ; la production d'un million de souris, ou même de drosophiles, requiert un investissement énorme, en temps, en argent et en espace de laboratoire. Comme nous allons souvent parler de micro-organismes dans les paragraphes qui suivent, passons brièvement en revue quelques techniques microbiologiques.

Techniques microbiologiques

Les microbes considérés dans cet ouvrage sont essentiellement des bactéries, des champignons et des algues unicellulaires qui peuvent être considérés comme haploïdes. Les champignons et les algues sont des eucaryotes (leurs chromosomes sont à l'intérieur d'un noyau entouré d'une membrane nucléaire), alors que les bactéries sont des **procaryotes** (leur chromosome est généralement

BCU LAUSANNE / CENTRE UNIVERSITAIRE LIBRARY

Tableau 7-2. Taux ou fréquences de mutations chez différents organismes

Organisme	Mutation	Valeur	Unités
Bactériophage T2 (virus bactérien)	Inhibition de la lyse $r \rightarrow r^+$	1×10^{-8}	*Taux* : nombre de gènes mutants par réplication
	Spécificité d'hôte $h^+ \rightarrow h$	3×10^{-9}	
Escherichia coli (bactérie)	Fermentation du lactose $lac^- \rightarrow lac^+$	2×10^{-7}	*Taux* : nombre de cellules mutantes par division cellulaire
	Auxotrophie pour l'histidine $his^- \rightarrow his^+$	4×10^{-8}	
	$his^+ \rightarrow his^-$	2×10^{-6}	
Chlamydomonas reinhardtii (algue)	Sensibilité à la streptomycine *str-s* → *str-r*	1×10^{-6}	
Neurospora crassa (champignon)	Auxotrophie pour l'inositol $inos^- \rightarrow inos^+$	8×10^{-8}	*Fréquence* par spore asexuée
	Auxotrophie pour l'adénine $ad^- \rightarrow ad^+$	4×10^{-8}	
Maïs	Voir tableau 7-1		
Drosophila melanogaster (mouche du vinaigre)	Couleur de l'œil $W \rightarrow w$	4×10^{-5}	
Souris	Dilution $D \rightarrow d$	3×10^{-5}	
Homme			
autosomiques dominantes	Chorée de Huntington	1×10^{-6}	
	Syndrome nail-patella	2×10^{-6}	
	Epiloia (prédisposition à un certain type de tumeur cérébrale)	$4 - 8 \times 10^{-6}$	*Fréquence* par gamète
	Polypes multiples du gros intestin	$1 - 3 \times 10^{-5}$	
	Achondroplasie (nanisme)	$4 - 12 \times 10^{-5}$	
	Neurofibromatose (prédisposition à des tumeurs du système nerveux)	$3 - 25 \times 10^{-5}$	
récessives liées à X	Hémophilie A	$2 - 4 \times 10^{-5}$	
	Dystrophie musculaire de Duchenne	$4 - 10 \times 10^{-5}$	
cellules de la moelle osseuse en culture	Normale → résistance à l'azaguanine	7×10^{-4}	*Taux* : nombre de cellules mutantes par division cellulaire

SOURCE : R. Sager et F.J. Ryan, *Heredity*, John Wiley, 1961.

circulaire et n'est pas inclus dans un compartiment séparé).

Cultivés en milieu liquide, les organismes unicellulaires prolifèrent sous forme de suspension de cellules individuelles. Chaque cellule de départ passe par un grand nombre de divisions cellulaires, de sorte qu'une série de 2, 4, 8, 16,... cellules filles sont produites à partir de chacune d'entre elles. Cette croissance exponentielle est limitée par la disponibilité des substances nutritives dans le milieu. Rapidement, une suspension dense de plusieurs millions de cellules sera produite. Des champignons tels que les levures suivent exactement le même schéma de croissance. La situation diffère légèrement chez les champignons à mycélium où les cellules filles restent attachées en longues chaînes appelées hyphes ; la culture en milieu liquide se transforme rapidement en une sorte de bouillon au tapioca, contenant de petites boules d'hyphes en suspension, chacune descendant d'une spore.

En milieu solide, généralement sur une surface de gel d'agar, les cellules filles restent ensemble et forment des colonies. Une colonie se développe à partir de chaque cellule mère de la suspension étalée sur le milieu solide.

Quelles sortes de phénotypes peut-on observer chez les microorganismes ? Les mutations morphologiques qui altèrent la couleur, la forme, la taille des colonies, sont utiles mais le choix en est limité. D'autres caractères ont été bien plus exploités : par exemple, les mutations auxotrophes (ces cellules requièrent-elles l'addition d'un supplément nutritionnel spécifique ?), les mutations de résistance (ces cellules poussent-elles en présence d'un inhibiteur particulier de la croissance ?), les mutations cataboliques (ces cellules peuvent-elles utiliser un sucre particulier comme source d'énergie ainsi que le fait le type sauvage ?).

Retournons maintenant à quelques exemples de systèmes sélectifs.

Réversion de mutants auxotrophes

Pour détecter la réversion d'un mutant auxotrophe vers la prototrophie, il existe un système direct de sélection. Un mutant auxotrophe pour l'adénine par exemple est mis en culture dans un milieu contenant de l'adénine. La suspension est ensuite étalée sur un milieu solide ne contenant pas d'adénine. Les seules cellules qui pourront proliférer sur ce milieu sont celles qui n'ont plus besoin d'adénine pour pousser, et qui sont apparues à la suite de la formation d'une mutation réverse dans la culture de départ (figure 7-17). Pour la plupart des gènes (pas seulement pour ceux qui sont impliqués dans la nutrition), le taux de mutation réverse (réversion) est généralement plus faible encore que le taux de mutation vers l'auxotrophie (nous verrons pourquoi plus loin).

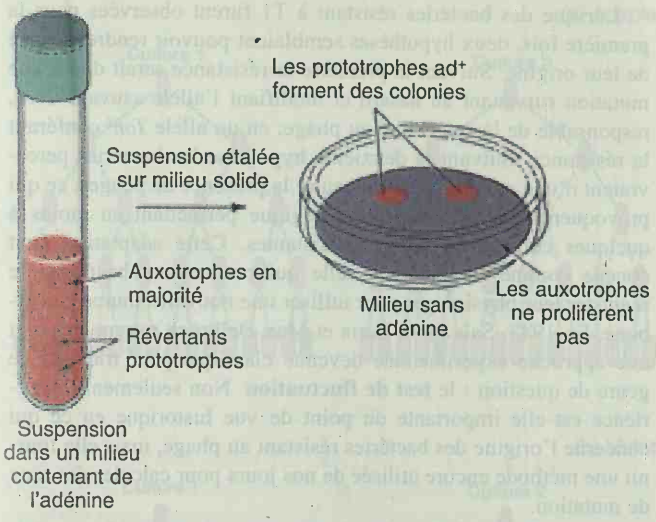


Figure 7-17. Sélection de révertants prototrophes à partir de mutants auxotrophes exigeant l'adénine.

L'analyse de la réversion de mutations auxotrophes a très tôt révélé une complication. Certaines colonies prototrophes s'avérèrent ne pas être de véritables révertants mais plutôt porteuses d'une mutation à un locus différent. Celle-ci agit comme suppresseur de l'auxotrophie. Si nous représentons la mutation originale par *m* et le suppresseur par *s*, le révertant apparent est en fait de génotype *ms*. Les mutations suppresseurs ne sont généralement pas aussi fréquentes que les mutations réverses. On peut les distinguer de ces dernières par croisement avec la souche sauvage et réapparition du phénotype mutant original parmi les descendants:

$ms \times ++$

↓

ms	prototrophe
++	prototrophe
+*s*	prototrophe
m+	auxotrophe

Un vrai révertant, qui serait m^+ ne produirait que des descendants prototrophes après croisement avec le sauvage.

Message Dans toute expérience de réversion, les vrais révertants doivent être distingués des mutations suppresseurs survenant à un autre locus.

Enrichissement par filtration

Cette méthode est utilisée pour sélectionner des mutants auxotrophes de champignons à mycélium tels que *Neurospora* et *Aspergillus*. C'est précisément cette production d'un réseau d'hyphes qui est à la base de la méthode d'**enrichissement par filtration**. Supposons que l'investigateur désire obtenir des auxotrophes requérant spécifiquement la leucine, un acide aminé. De tels mutants peuvent être dus à une mutation du type *leu*+ vers *leu* à plusieurs loci différents. Le chercheur commence par faire croître une culture du type sauvage et obtient ainsi un grand nombre de conidies. La plupart de celles-ci seront naturellement *leu*+. Cependant, comme il se produit continuellement des mutations, certaines conidies seront porteuses d'un allèle mutant *leu*. Elles seront sélectionnées comme suit. Les conidies sont ensemencées en milieu minimal liquide dans une fiole et incubées pendant une nuit en agitant doucement la culture. Chaque conidie prototrophe aura germé et produit une colonie constituée de filaments (les hyphes du mycélium). Au contraire, les conidies auxotrophes de toute nature y compris les mutants *leu* n'auront pas formé de centre de croissance. On verse alors le contenu de la fiole au travers de plusieurs épaisseurs de gaze fine en guise de filtre. Les colonies prototrophes sont prises dans les fibres de la gaze alors que les auxotrophes restées unicellulaires passent au travers (figure 7-18). Les cellules qui sont passées sont alors étalées sur un milieu minimum additionné de leucine. Chaque auxotrophe pour la leucine croîtra et formera une colonie visible mais les autres caté-

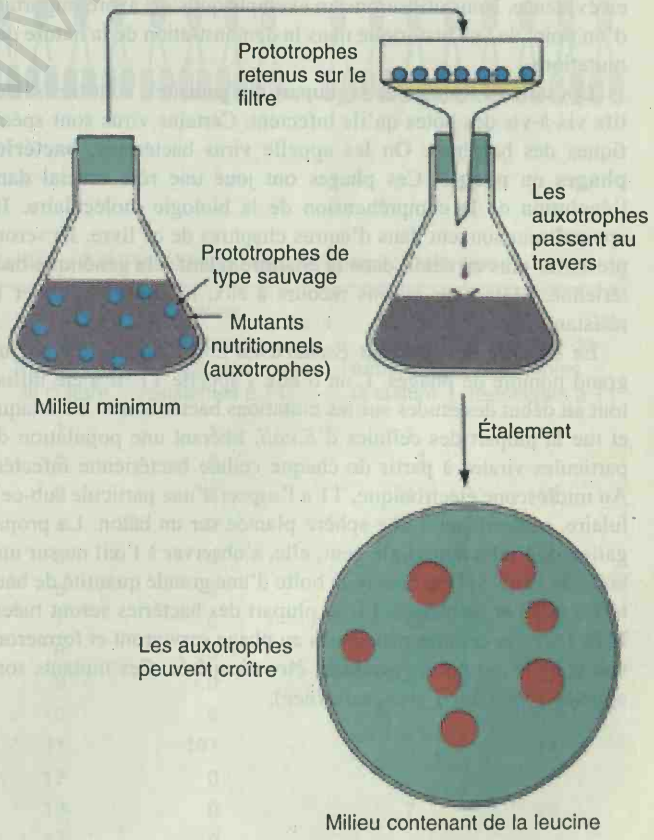


Figure 7-18. Méthode d'enrichissement par filtration destinée à sélectionner des mutations auxotrophes chez les champignons mycéliens. (Cet exemple concerne des mutations menant à l'exigence pour la leucine).

gories d'auxotrophes resteront à l'état de cellules isolées. Enfin, les colonies sont isolées au moyen d'une aiguille et transférées dans des tubes de culture contenant du milieu enrichi. De cette manière il est relativement aisé d'amasser un grand nombre de mutants auxotrophes.

Enrichissement à la pénicilline

Il existe une technique analogue pour la sélection de mutants auxotrophes de bactéries. La plupart des bactéries sont très sensibles à la pénicilline, mais seulement lorsqu'elles sont en croissance. Si l'on ajoute cet antibiotique à une suspension de bactéries en croissance, les cellules prototrophes sont tuées parce qu'elles prolifèrent, mais les auxotrophes survivent. On peut enlever la pénicilline en lavant les cellules récupérées sur un filtre. En étalant les bactéries lavées sur un milieu solide contenant le ou les additifs appropriés, on autorisera la croissance des seuls mutants que l'on désire récupérer.

Résistance

La résistance à des agents de l'environnement qui ne sont normalement pas tolérés par les micro-organismes est facile à mettre en évidence. Nous utiliserons un exemple qui s'est avéré important d'un point de vue historique dans la démonstration de la nature des mutations.

Les virus, à l'image de la plupart des parasites, sont très sélectifs vis-à-vis des hôtes qu'ils infectent. Certains virus sont spécifiques des bactéries. On les appelle virus bactériens, **bactériophages** ou **phages**. Ces phages ont joué une rôle crucial dans l'évolution de la compréhension de la biologie moléculaire. Ils apparaîtront souvent dans d'autres chapitres de ce livre. Ils seront présentés plus en détail dans le chapitre relatif à la génétique bactérienne. Mais nous aurons recours à eux, ici, pour expliquer la résistance.

La bactérie de l'intestin *Escherichia coli* est parasitée par un grand nombre de phages. L'un d'eux s'appelle T1. Il a été utilisé tout au début des études sur les mutations bactériennes. T1 attaque et tue la plupart des cellules d'*E.coli,* libérant une population de particules virales à partir de chaque cellule bactérienne infectée. Au microscope électronique, T1 a l'aspect d'une particule sub-cellulaire, ressemblant à une sphère plantée sur un bâton. La propagation de l'infection virale peut, elle, s'observer à l'œil nu sur une boîte de Pétri. Si l'on couvre la boîte d'une grande quantité de bactéries (10^9) et de phages T1, la plupart des bactéries seront tuées. Mais les rares cellules résistantes au phage survivront et formeront une colonie qui pourra aisément être récupérée. Ces mutants sont appelés *Ton*^{r} (pour *T-one resistance*).

Lorsque des bactéries résistant à T1 furent observées pour la première fois, deux hypothèses semblaient pouvoir rendre compte de leur origine. Suivant la première la résistance serait due à une mutation survenant au hasard et modifiant l'allèle sauvage *Ton*^{s}, responsable de la sensibilité au phage, en un allèle *Ton*^{r} conférant la résistance. Suivant la deuxième hypothèse les bactéries percevraient d'une manière ou d'une autre la présence de phages, ce qui provoquerait une réponse physiologique permettant au moins à quelques cellules de devenir résistantes. Cette adaptation était conçue comme semblable à celle qui permet aux bactéries de réajuster leur physiologie pour utiliser une nouvelle source de carbone. En 1943, Salvadore Luria et Max Delbrück mirent au point une approche expérimentale devenue classique pour trancher ce genre de question : le **test de fluctuation**. Non seulement l'expérience est-elle importante du point de vue historique en ce qui concerne l'origine des bactéries résistant au phage, mais elle fournit une méthode encore utilisée de nos jours pour calculer des taux de mutation.

Luria et Delbrück firent le raisonnement suivant, qui les conduisit à prédire des résultats expérimentaux différents selon que l'on interprétât l'origine des bactéries résistantes par une mutation ou par une adaptation physiologique. Voyons d'abord l'hypothèse de la mutation. Celle-ci est un événement peu fréquent et qui se produit au hasard ; par conséquent au plus tôt elle surviendra, au plus important sera le clone de cellules résistantes qui en résultera. Selon cette hypothèse, on peut donc s'attendre à une variation considérable en ce qui concerne le nombre de cellules résistantes d'une culture à l'autre (Luria et Delbrück utilisèrent le terme fluctuation plutôt que variation). Par contre, si l'on raisonne en termes d'adaptation physiologique, il n'y a aucune raison de s'attendre à une telle variation la réponse physiologique devant être assez reproductible. Ces prédictions antagonistes sont représentées sur la figure 7-19.

Luria et Delbrück procédèrent comme suit. Dans 20 cultures indépendantes contenant chacune 0,2 ml de milieu et dans une autre de 10 ml, ils inoculèrent 10^3 bactéries par millilitre et les incubèrent jusqu'à ce qu'elles contiennent 10^8 cellules par millilitre. Chacune des cultures de 0,2 ml fut ensuite étalée sur un milieu solide préalablement inoculé par une solution dense de phages T1. De la culture de 10 ml, ils étalèrent 10 échantillons de 0,2 ml chacun, dans les mêmes conditions. On voit dans le tableau 7-3 qu'ils obtinrent un grand nombre de mutants résistant à T1.

La variation entre les différentes cultures de 0,2 ml était flagrante alors que les différents échantillons de 0,2 ml issus de la grande culture qui servaient de contrôle, contenaient tous plus ou moins le même nombre de mutants. Ce résultat ne pouvait pas s'expliquer par l'adaptation physiologique vu que chacun des échantillons de 0,2 ml (qu'il provînt de la grosse culture, ou qu'il fût une petite culture), contenait plus ou moins le même nombre

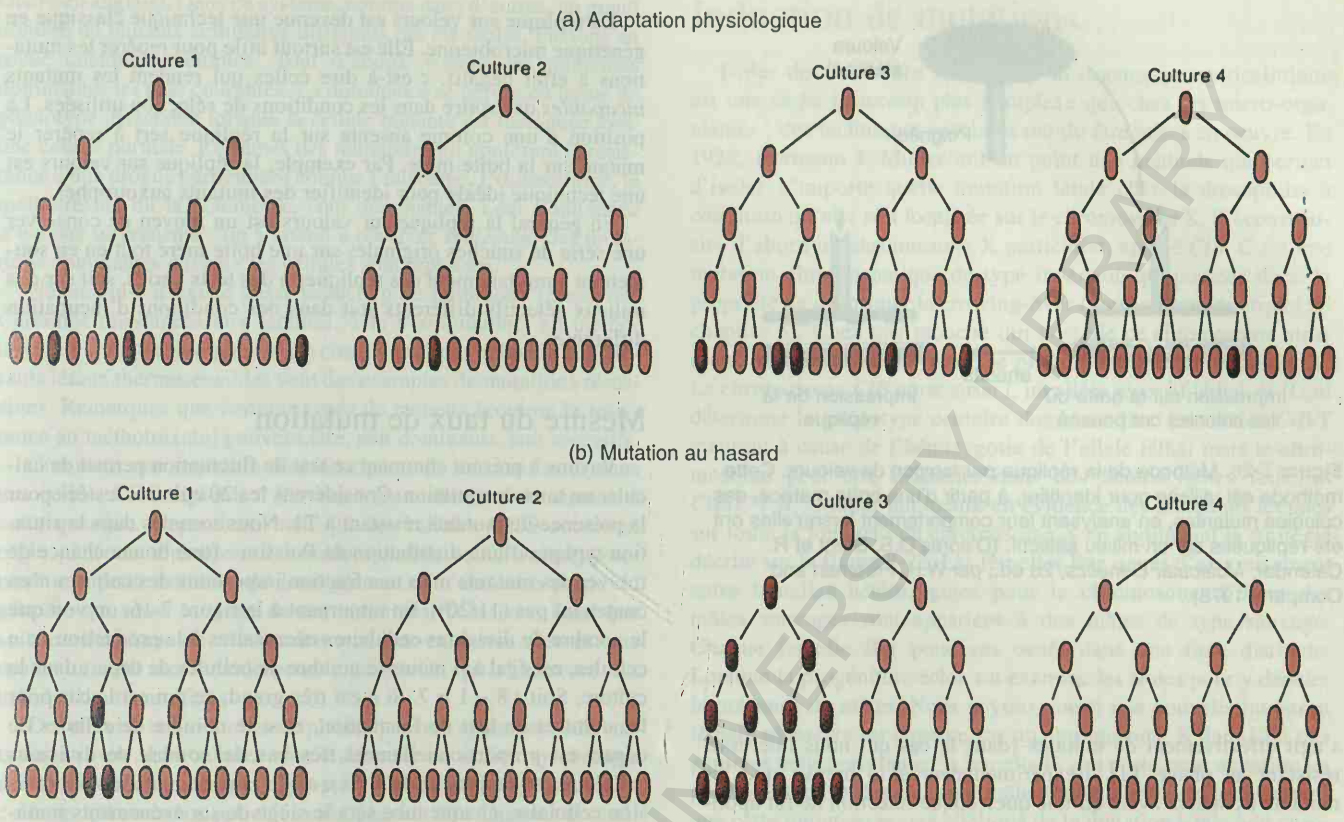


Figure 7-19. Pedigrees cellulaires illustrant les prédictions de deux théories opposées sur l'origine des cellules résistantes. (a) Adaptation physiologique. (b) Changement génétique survenant au hasard. (D'après G.S. Stent et R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2d ed., par W.H. Freeman and Company 1978).

total de bactéries. L'interprétation la plus simple du résultat était qu'un changement génétique se fut produit au hasard, soit peu de temps après l'inoculation de la culture (beaucoup de mutants), soit longtemps après (peu de mutants).

Cette analyse, très élégante et très simple, suggérait que les cellules résistantes préexistaient à la sélection et n'étaient pas produites par des facteurs de l'environnement (les phages dans ce cas-ci). La préexistence des mutants peut-elle être mise en évidence *avant* la sélection ? Ceci fut fait grâce à la technique de la **réplique sur velours,** mise au point par Joshua et Esther Lederberg en 1952. Un morceau de velours stérile est tendu sur un tampon cylindrique. Une boîte de Petri, sur laquelle se sont développées des colonies bactériennes, est délicatement mise en contact avec la surface du velours qui retient une partie des bactéries de chaque colonie. Le tampon sert ensuite de matrice pour imprimer une nouvelle boîte contenant un milieu stérile (figure 7-20). Des colonies se développeront sur la deuxième boîte exactement au même endroit que sur la première. Cette technique permet de faire pousser des bactéries en milieu non sélectif (un milieu riche sans antibiotique et sans phage par exemple) et d'en faire ensuite une copie sur un milieu sélectif (minimum ou riche additionné d'un antibiotique ou de phages), comme le décrit la figure 7-21. Certaines des cellules de certaines colonies de la boîte mère forment des colonies lorsqu'elles sont transférées sur le milieu sélectif. Les cellules de ces colonies-là peuvent être retestées à partir de la boîte mère. S'il

Tableau 7-3. Résultats du test de Luria et Delbrück

Cultures individuelles		Grande culture	
Numéro de la culture	Nombre de colonies résistantes à T1	Numéro de la culture	Nombre de colonies résistantes à T1
1	1	1	14
2	0		
3	3	2	15
4	0		
5	0	3	13
6	5		
7	0	4	21
8	5		
9	0	5	15
10	6		
11	107	6	14
12	0		
13	0	7	26
14	0		
15	1	8	16
16	0		
17	0	9	20
18	64		
19	0	10	13
20	35		
	Moyenne 11,3		Moyenne 16,7

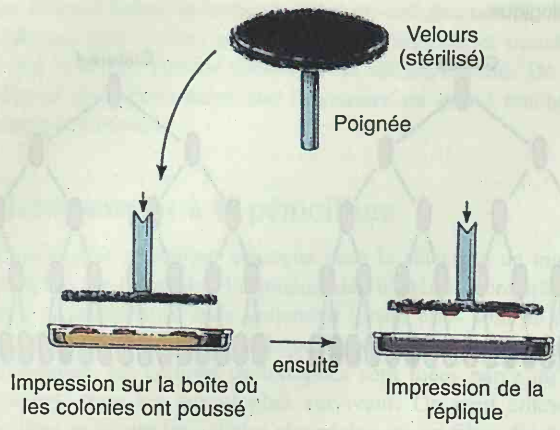


Figure 7-20. Méthode de la réplique par tampon de velours. Cette méthode est utilisée pour identifier, à partir d'une boîte matrice, des colonies mutantes, en analysant leur comportement lorsqu'elles ont été répliquées sur un milieu sélectif. (D'après G.S. Stent et R. Calendar, *Molecular Genetics,* 2d ed., par W.H. Freeman and Company 1978).

s'agit effectivement de mutants (dans le cas qui nous intéresse, résistant au phage T1), l'expérimentateur a la preuve que les mutants existaient avant qu'une quelconque sélection ne fût appliquée aux bactéries.

Message La mutation est un processus aléatoire qui peut se produire n'importe quand dans n'importe quelle cellule.

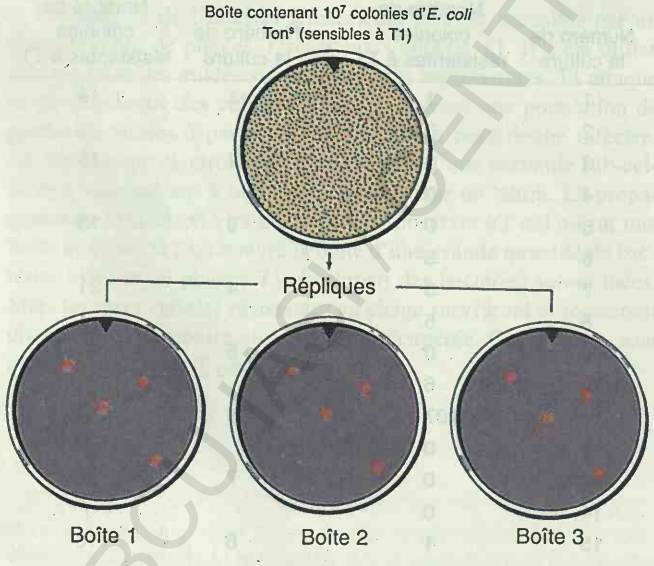


Figure 7-21. Utilisation de la méthode de réplique par tampon de velours pour démontrer la présence de mutants avant la sélection. Ce sont les mêmes colonies qui apparaissent sur les trois répliques, ce qui prouve que les colonies résistantes existaient sur la boîte mère. (D'après G.S. Stent et R. Calendar, *Molecular Genetics,* 2d ed., par W.H. Freeman and Company 1978).

La réplique sur velours est devenue une technique classique en génétique microbienne. Elle est surtout utile pour repérer les mutations à effet négatif, c'est-à dire celles qui rendent les mutants *incapables* de croître dans les conditions de sélection utilisées. La position d'une colonie absente sur la réplique sert à repérer le mutant sur la boîte mère. Par exemple, la réplique sur velours est une technique idéale pour identifier des mutants auxotrophes.

En général la réplique sur velours est un moyen de conserver une série de souches originales sur une boîte mère tout en en soumettant simultanément des répliques à des tests variés, soit sur des milieux sélectifs différents soit dans des conditions d'incubation différentes.

Mesure du taux de mutation

Voyons à présent comment ce test de fluctuation permet de calculer un taux de mutation. Considérons les 20 cultures testées pour la présence de mutants résistant à T1. Nous sommes dans la situation typique d'une distribution de Poisson : (une bonne chance de trouver des mutants mais une fraction importante des cultures n'en contenant pas (11/20)). En retournant à la figure 7-16, on voit que le nombre de divisions cellulaires nécessaires à la production de n cellules, est égal à n moins le nombre de cellules de départ dans la culture. Soit : $8 - 1 = 7$. Si n est très grand, ce qui est le cas pour les cultures du test de fluctuation, et si le nombre de cellules de départ est proportionnellement très bas, le nombre de divisions cellulaires se rapproche de n. Si μ est le taux de mutation par division cellulaire, chaque tube sera le siège de μn événements mutationnels. La distribution de Poisson (voir p. 157) nous dit que la classe zéro (c'est-à-dire le nombre de tubes qui ne contiennent pas de mutants) vaut $e^{-\mu n}$. Nous savons que cette classe équivaut à 11/20, soit 0,55 et donc que $n = 0{,}2 \times 10^8$. Nous pouvons donc résoudre l'équation :

$$0{,}55 = e^{-\mu(0{,}2 \times 10^8)}$$

et trouver la valeur de μ, soit 3×10^{-8} événements mutationnels par division cellulaire. Notons que pour le même résultat, la fréquence relative des mutants, elle, vaut $(1 + 3 + 5 + 6 + 107 + 1 + 64 + 35) / (20 \times 0{,}2 \times 10^8)$, c'est-à-dire $227 / (4 \times 10^8)$, soit $5{,}7 \times 10^{-7}$.

Isolement de mutants à partir de cellules de plantes et d'animaux

On peut cultiver les cellules d'organismes supérieurs (animaux et plantes) *in vitro*. Les cellules prélevées sur certains tissus y compris certaines tumeurs prolifèrent en culture de manière analogue aux microbes. Les techniques d'induction et de sélection de mutants sont également applicables aux cellules supérieures. Ceci a mené au développement intensif de la **génétique cellulaire somatique.** En combinant les techniques de sélection de mutants, des techniques sophistiquées de fusion de cellules et d'hybridation, on peut de nos jours effectuer sur les cellules d'organismes supérieurs, y compris des cellules humaines, toute une série de manipulations *in vitro*.

Un système de culture de cellules très utilisé est celui des cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO, pour *Chinese Hamster*

Ovary en anglais). Dans ce système, comme dans d'autres, un grand nombre de mutants cellulaires différents ont été isolés. Passons en revue quelques exemples. Tout d'abord, voyons les mutations dominantes les plus courantes. La dominance se définit en terme de phénotype détectable lorsque la cellule mutante est fusionnée avec une cellule normale. Certaines des mutations qui confèrent la résistance à une drogue particulière comme l'ouabaïne, l'α-amanitine, le méthotrexate ou la colchicine, sont dominantes. Leur dominance n'est pas surprenante : on s'attend à observer *seulement* des mutations dominantes puisque les cellules sont diploïdes.

Néanmoins, il existe aussi beaucoup de mutations récessives. Certaines résistances aux lectines, à la 8-azaguanine, au méthotrexate, l'auxotrophie pour la glycine, la proline, la lysine et différents létaux thermosensibles sont des exemples de mutations récessives. Remarquez que certains types de mutants (comme la résistance au méthotrexate) peuvent être, soit dominants, soit récessifs.

Comment une mutation récessive peut-elle se manifester dans une cellule CHO diploïde ? Personne n'a réellement de réponse à cette question. Cependant, bien que les cellules CHO soient en règle générale diploïdes, il semble qu'elles soient *hémizygotes* pour une petite fraction de leur génome et c'est cette partie du génome qui serait le siège de ces mutations récessives. Quel que soit le mécanisme de telles mutations, leur existence n'en est pas moins un outil inestimable pour le généticien qui s'intéresse aux cellules de mammifères.

Des cellules individuelles de plantes peuvent également être cultivées *in vitro*. Les cellules sont étalées sur un milieu synthétique additionné d'un mélange approprié d'hormones végétales. Les colonies qui poussent, appelées **cals**, peuvent être séparées et réutilisées pour inoculer de nouvelles cultures. Elles peuvent aussi être transférées sur un autre milieu qui induit la différenciation en racines ou en pousses. Ces plantules peuvent être ensuite repiquées en pots, dans de la terre, et donner des plantes adultes. L'une des applications de ces techniques fut l'isolement de plantes résistant à une toxine produite par un champignon. A partir des cals développés sur un milieu contenant la toxine, des plantes adultes furent régénérées qui s'avérèrent, elles aussi, résister à la toxine fongique.

Induction de mutations

Isoler des mutations rares dans un organisme multicellulaire est une tâche beaucoup plus complexe que chez les micro-organismes ; des techniques spéciales ont du être mises en oeuvre. En 1928, Hermann J. Muller mit au point une méthode qui permet d'isoler n'importe quelle mutation létale chez la drosophile, à condition qu'elle soit localisée sur le chromosome X. Il «construisit» d'abord un chromosome X particulier, appelé *ClB*. C est une mutation chromosomique du type inversion qui possède donc la propriété de supprimer le crossing-over (nous verrons pourquoi au chapitre 8). Chez une mouche qui possède ce chromosome ainsi muté, aucun crossing-over ne se produit entre les chromatides X. Le chromosome *ClB* porte aussi *l*, un allèle récessif léthal, et *B* qui détermine le phénotype oculaire dominant Bar. Les mâles *ClB/Y* meurent à cause de l'hémizygotie de l'allèle léthal mais le chromosome peut être maintenu dans des hétérozygotes femelles $ClB/C^+l^+B^+$. Muller put mettre en évidence des mutations léthales sur toute la longueur du chromosome X en appliquant la stratégie décrite sur la figure 7-22. Les femelles Bar issues d'un croisement entre femelles hétérozygotes pour le chromosome *ClB* et des mâles sauvages sont appariées à des mâles de type sauvage. Chaque femelle Bar pond ses oeufs dans une fiole distincte. Lorsque la progéniture éclot, on examine les fioles pour y déceler la présence de mâles. Nous voyons que si une nouvelle mutation léthale récessive est apparue sur un chromosome X dans l'un des gamètes mâles originaux, la femelle F_1 qui porte cette mutation ne produira aucune descendance mâle viable. Ce n'est que rarement que cette mutation *m* sera allélique de la mutation létale *l* du chromosome *ClB*. Si cela se produisait, la femelle *ClB / l* mourrait. L'absence de mâles dans un récipient se détecte facilement sous faible agrandissement, et permet de distinguer aisément la présence de mutations létales sur le chromosome X. Muller mesura ainsi leur fréquence spontanée d'apparition qui est d'environ 1,5 × mille chromosomes, une valeur relativement faible si l'on tient compte du fait qu'un grand nombre de gènes est impliqué sur ce chromosome.

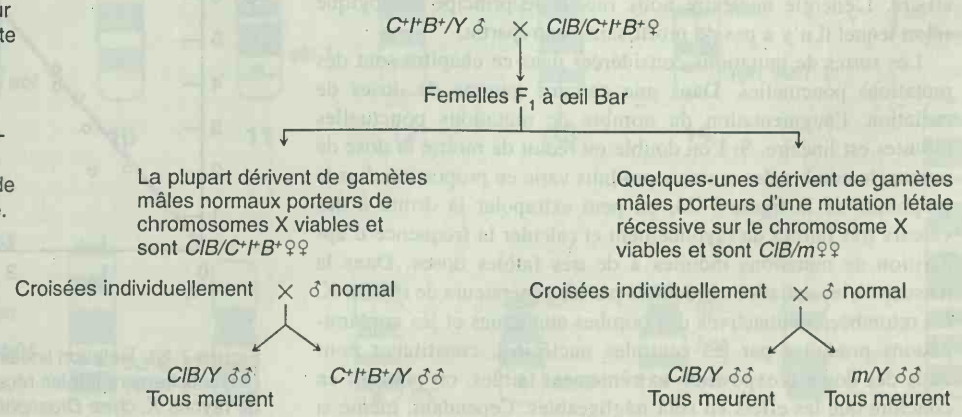


Figure 7-22. Utilisation du test *ClB* pour identifier des mutations de *Drosophila* sur le chromosome. Le symbole *m* représente une mutation létale récessive localisée n'importe où sur le chromosome X. Rechercher la présence ou l'absence de mâles dans chaque descendance examinée séparément revient en fait à trier un échantillon de gamètes du parent mâle de la femelle Bar F_1 par l'analyse génétique.

Tableau 7-4. Efficacité relative de différents types de radiations provoquant des mutations chez Drosophila

Type de radiation	Pourcentage de chromosomes mâles X porteurs de mutations récessives létales après une dose de 1000 roentgens*
Lumière visible (spontanée)	0,15
Rayons X (25Mev)	1,70
Rayons β, rayons γ, rayons X durs	2,90
Rayons X mous	2,50
Neutrons	1,90
Rayons α	0,84

* Le roentgen (r) est une unité d'énergie de radiation.

Muller se mit ensuite en quête d'agents qui augmenteraient la fréquence d'apparition des mutants. En utilisant le test *ClB*, il détermina la fréquence de mutations létales liées au chromosome X après avoir irradié les mâles aux rayons X. Il observa une augmentation considérable. Ce résultat fournit la première démonstration expérimentale de l'existence de mutagènes, dans le cas présent, les rayons X. Rappelons qu'un mutagène est un agent qui provoque la formation de mutations à une fréquence supérieure à la fréquence d'apparition spontanée. Les mutagènes ont été des outils inestimables, non seulement pour étudier les mécanismes de la mutagénèse, mais aussi pour en augmenter le rendement. On sait actuellement que de nombreux types de rayonnements augmentent le taux de mutation.

Le tableau 7-4 montre les effets de différents rayonnements sur la fréquence d'apparition de mutants chez la drosophile. A cette liste, il faut ajouter les ultra-violets (UV) qui sont mutagènes aussi. Les radiations sont souvent classées en ionisantes et non ionisantes, suivant que des ions soient ou non produits dans le tissu irradié. Les rayons X et γ (gamma) sont des exemples classiques des premières radiations, les rayons UV des secondes.

L'exploitation de l'énergie nucléaire (pour la fourniture d'énergie ou la construction d'armes) est devenue un important problème de société de par l'effet mutagène des radiations. Même l'utilisation pacifique de l'énergie nucléaire comporte des risques. Aucune enceinte n'est totalement sûre et les dernières décades nous ont fourni des exemples de fuites accidentelles d'isotopes. En outre le traitement des déchets nucléaires n'est pas une mince affaire. L'énergie nucléaire nous rapelle le principe écologique selon lequel il n'y a pas de profit sans contrepartie.

Les sortes de mutations considérées dans ce chapitre sont des mutations ponctuelles. Dans une certaine gamme de doses de radiation, l'augmentation du nombre de mutations ponctuelles induites est linéaire. Si l'on double ou réduit de moitié la dose de rayons, le nombre des mutants produits varie en proportion. Sur le graphique de la figure 7-23, on peut extrapoler la droite à des valeurs très faibles de rayonnement et calculer la fréquence d'apparition de mutations induites à de très faibles doses. Dans la mesure où les radiations produites par les générateurs de rayons X, les retombées radioactives des bombes atomiques et les contaminations produites par les centrales nucléaires, constituent pour nous des doses d'exposition extrêmement faibles, on pourrait en conclure que les effets en sont négligeables. Cependant, même si l'augmentation du taux de mutation est bas, la population exposée est très grande. Chaque année, 200 millions de nouveaux gamètes forment 100 millions de nouveau-nés de par le monde. Dans cette immense expérience annuelle de mutagénèse, même un taux faible de mutation se traduit par la naissance d'un grand nombre de bébés mutants.

Les doses de rayonnement sont cumulatives. Une population exposée de manière répétitive verra sa fréquence de mutations induites augmenter en proportion directe de la quantité *totale* de radiation subie au cours du temps. Il y a cependant des exceptions aux effets additifs et cumulatifs. Considérons, par exemple, deux groupes de souris qui seraient irradiées les unes avec une dose unique et importante de x rads (une mesure biologique de la dose de rayonnement), et les autres progressivement à petites doses pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois, jusqu'à avoir reçu la même dose totale (on parle alors de doses chroniques). Les souris du second groupe développeront significativement moins de mutations que celles du premier. Cette différence est un indice de l'existence de systèmes qui, au cours du temps, réparent les dommages génétiques causés par les radiations.

La découverte du pouvoir mutagène de certains agents chimiques fut aussi d'un intérêt marquant pour les généticiens. Ce sont Charlotte Auerbach et J.M. Robson qui furent les premiers (en 1947) à démontrer la mutagénèse chimique, en utilisant des gaz «moutarde» qui avaient été utilisés précédemment comme gaz de

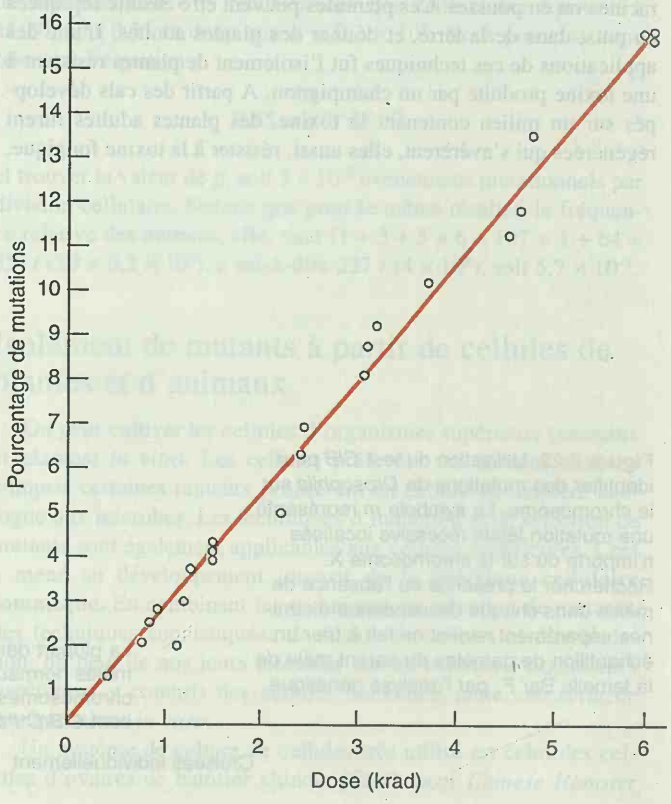


Figure 7-23. Relation linéaire entre le pourcentage de mutations (essentiellement létales récessives liées au sexe) et la dose reçue de rayons X, chez *Drosophila melanogaster.*

combat. Ces études ont ouvert la voie à l'étude de l'effet mutagène de toute une série de substances chimiques et l'on sait à présent que bien des substances auxquelles nous sommes quotidiennement exposés sont des mutagènes. La fumée de cigarette en est un exemple évident mais il y en a bien d'autres tels que certains agents conservants, des pesticides, des herbicides, des produits industriels et des agents polluants. Certaines sont même des substances naturellement présentes dans nos aliments.

L'effet mutagène des substances chimiques est important, entre autres parce qu'il est souvent possible de déterminer les réactions chimiques qui mènent à l'apparition de la mutation. Ceci permet d'élucider certains aspects des mécanismes moléculaires de la mutagénèse. De plus, nombre d'agents chimiques sont moins toxiques pour l'organisme que les radiations, et provoquent cependant une fréquence de mutants nettement plus élevée. Ce sont les mutagènes chimiques qui ont été les plus utilisés pour isoler la batterie de mutations qui existent actuellement dans les collections biologiques à travers le monde.

Mutations et cancer

Il est clair à présent que le cancer est une maladie génétique. Les causes en sont multiples mais, en fin de compte, toutes agissent sur une classe de gènes particuliers appelés **proto-oncogènes**. Beaucoup d'entre eux ont été localisés comme le montre la figure 7-24. Normalement les oncogènes exercent des fonctions fondamentales dans la vie cellulaire, se rapportant généralement au

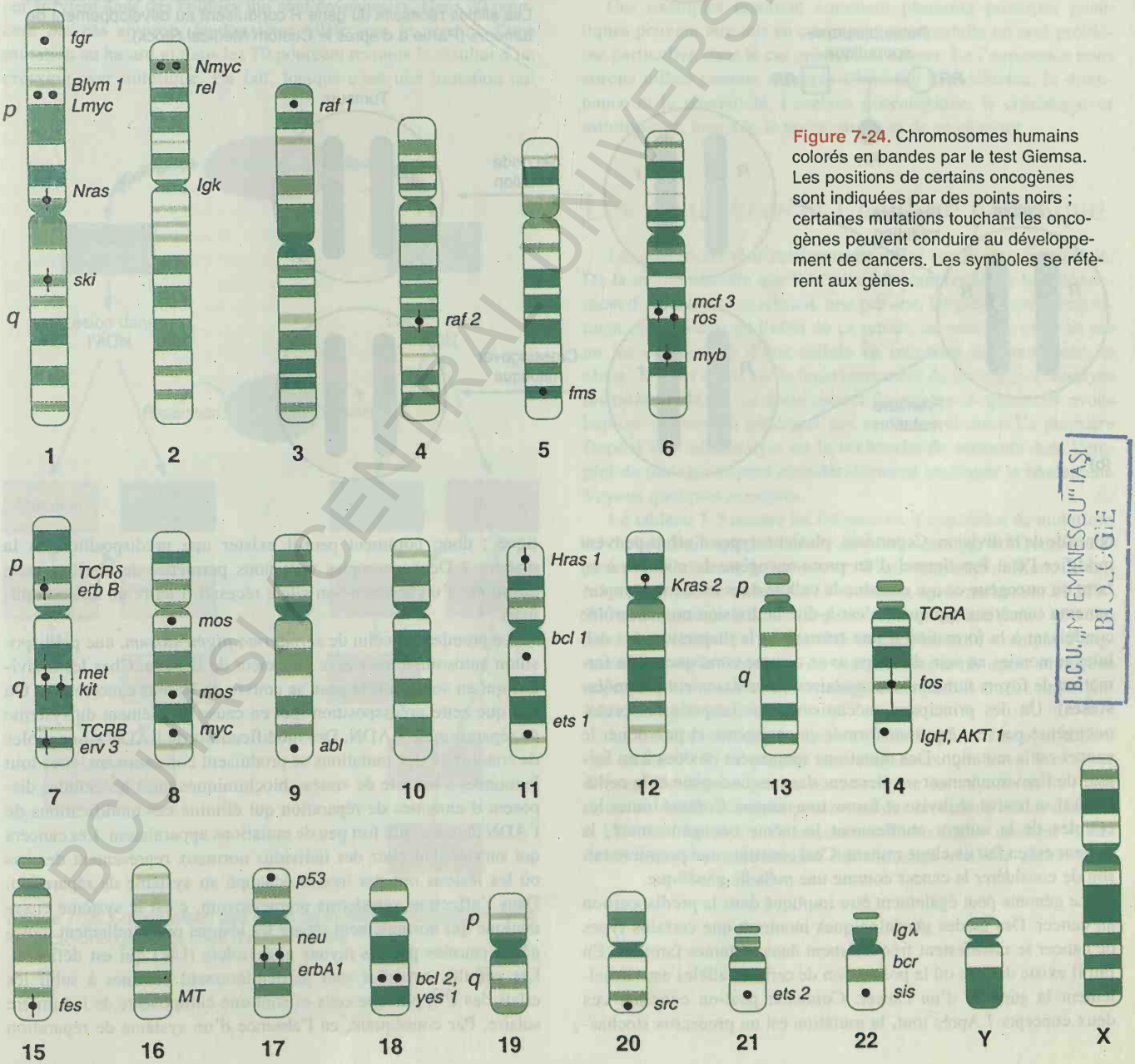
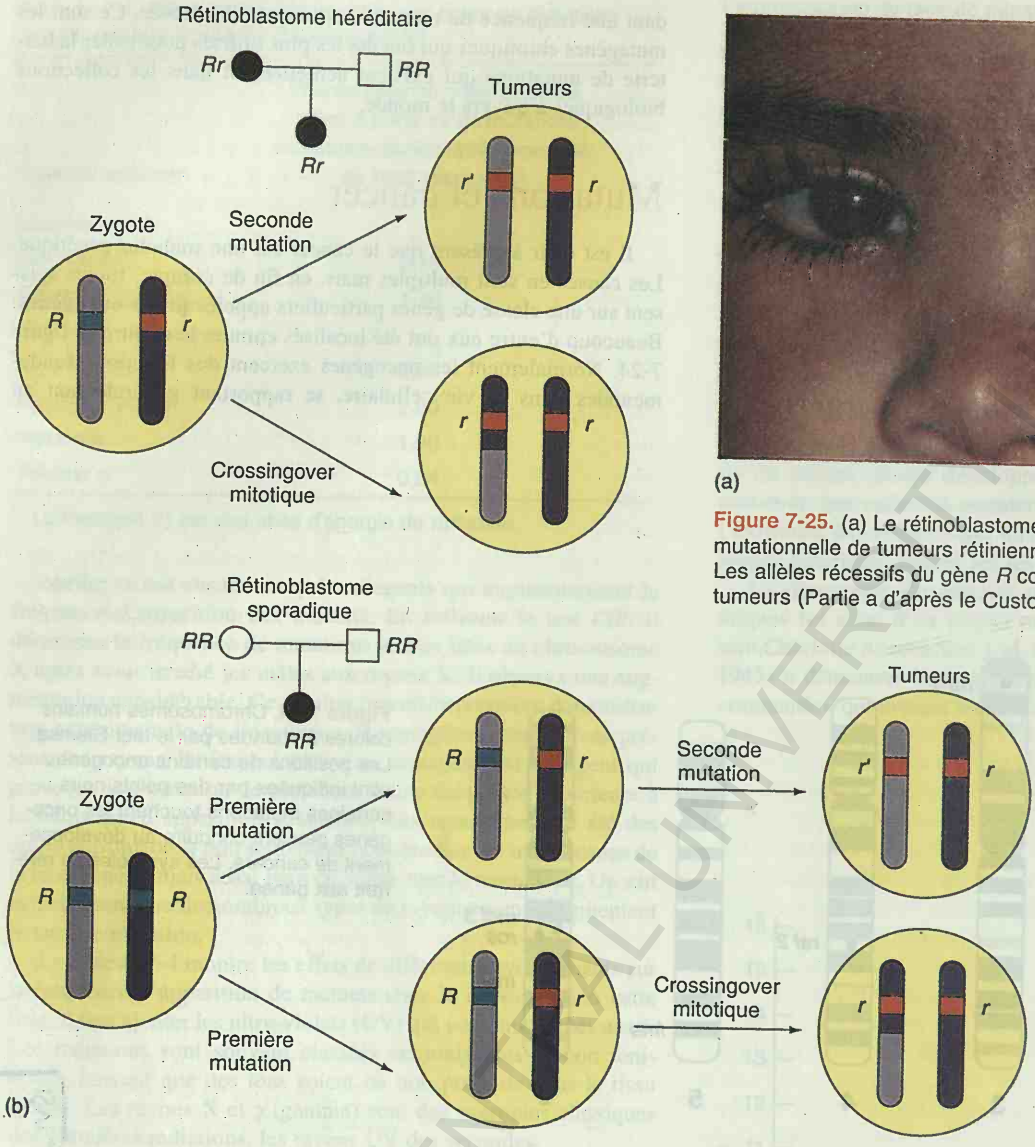


Figure 7-24. Chromosomes humains colorés en bandes par le test Giemsa. Les positions de certains oncogènes sont indiquées par des points noirs ; certaines mutations touchant les oncogènes peuvent conduire au développement de cancers. Les symboles se réfèrent aux gènes.

BCU „M. EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE



(a)

Figure 7-25. (a) Le rétinoblastome, cancer de la rétine. (b) L'origine mutationnelle de tumeurs rétiniennes héréditaires ou sporadiques. Les allèles récessifs du gène *R* conduisent au développement de tumeurs (Partie a d'après le Custom Medical Stock).

contrôle de la division. Cependant, plusieurs types d'effets peuvent modifier l'état fonctionnel d'un proto-oncogène de manière à en faire un **oncogène** ce qui entraîne la cellule dans les deux comportements cancéreux typiques, c'est-à-dire la division non contrôlée conduisant à la formation d'une **tumeur** et la dispersion des cellules tumorales au sein du corps avec comme conséquence la formation de foyers tumoraux secondaires (envahissement par **métastases**). Un des principaux mécanismes par lesquels les proto-oncogènes peuvent être transformés en oncogènes et provoquer le cancer est la mutation. Des mutations spontanées ou dues à un facteur de l'environnement surviennent dans un oncogène et la cellule où il se trouve se divise et forme une tumeur. Comme toutes les cellules de la tumeur contiennent le même oncogène muté, la tumeur est en fait un clone mutant. Ceci constitue une première raison de considérer le cancer comme une maladie génétique.

Le génome peut également être impliqué dans la prédisposition au cancer. Des études généalogiques montrent que certains types de cancer se manifestent fréquemment dans certaines familles. En fait il existe des cas où la possession de certains allèles est virtuellement la garantie d'un cancer. Comment peut-on concilier ces deux concepts ? Après tout, la mutation est un processus stochastique ; donc comment peut-il exister une prédisposition en la matière ? Deux exemples vont nous permettre de clarifier cette question ; l'un concerne un allèle récessif, l'autre un allèle dominant.

Le premier est celui de *xeroderma pigmentosum*, une prédisposition autosomale récessive au cancer de la peau. Chez les individus qui en souffrent, la peau se couvre de lésions cancéreuses. On sait que cette prédisposition met en cause un élément du système de réparation de l'ADN. Des modifications de l'ADN susceptibles de conduire à des mutations se produisent constamment, chez tout le monde, à la suite de «ratés» biochimiques mais les cellules disposent d'enzymes de réparation qui élimine ces modifications de l'ADN de sorte que fort peu de mutations apparaissent. Les cancers qui surviennent chez des individus normaux représentent des cas où les lésions ont par hasard échappé au système de réparation. Dans l'affection xeroderma pigmentosum, c'est le système enzymatique qui normalement répare les lésions potentiellement mutagènes causées par les rayons ultraviolets (UV) qui est déficient. Les cellules cutanées sont particulièrement enclines à subir les effets des UV, puisque ceux-ci sont une composante de la lumière solaire. Par conséquent, en l'absence d'un système de réparation

efficace, de nombreuses lésions cancéreuses se développent. Cette prédisposition est due à un allèle récessif ; dans un hétérozygote, l'allèle normal apporte le potentiel de réparation nécessaire.

Le deuxième exemple est le rétinoblastome, un cancer de la rétine. Le rétinoblastome peut apparaître de deux manières : soit sporadiquement, sans antécédents familiaux (la tumeur n'affecte généralement qu'un oeil, elle est dite unilatérale), soit comme la manifestation d'une prédisposition héréditaire que l'analyse des généalogies fait apparaître comme un allèle autosomique dominant. Dans ce type de rétinoblastome les deux yeux sont fréquemment touchés (tumeur bilatérale). Les deux types s'expliquent par le même mécanisme.

Tous les cas de rétinoblastomes (figure 7-25) sont dus à des mutations dans un gène, que nous appellerons *R*. Les allèles mutés *-r-* sont tous récessifs. Dans le rétinoblastome héréditaire, le déterminant transmis est un allèle *r*, de sorte que toutes les personnes qui développent le cancer sont nées avec le génotype *Rr*. Ceci semble à première vue contradictoire avec le caractère dominant de cette affection mais nous allons expliquer ce paradoxe. Le cancer survient dans des cellules qui sont devenues *rr*. Dans 30 pourcent des cas environ, le deuxième allèle sera le produit d'une mutation au hasard et dans les 70 pourcent restants le résultat d'un crossing-over mitotique. En fait, lorsque c'est une mutation qui intervient c'est un nouvel allèle qui apparaît, de sorte que le génotype réel est *rr'*. Dans le cas d'un crossing-over mitotique, c'est l'allèle original qui devient homozygote, *rr*. Ces processus sont schématisés dans la figure 7-25b. On peut voir à présent comment opère la prédisposition ; si l'on hérite d'un allèle mutant, un seul autre allèle doit muter pour que la maladie se déclenche. Ceci explique aussi pourquoi les deux yeux sont souvent affectés ; la probabilité du deuxième «événement r» est élevée parce que chaque rétine est composée de millions de cellules.

Une personne qui développe un rétinoblastome du type sporadique hérite du génotype *RR*. Pour qu'une tumeur se développe, deux allèles *rr* doivent apparaître, soit *rr'* par deux mutations indépendantes soit d'abord par une mutation vers l'état *Rr* suivie par un crossing-over mitotique (figure 7-25b). Comme deux événements sont nécessaires, le cancer ne survient généralement que dans un oeil. Le produit du gène *R* est très probablement un répresseur d'une protéine du cycle cellulaire. La mutation inactive le répresseur, ce qui déclenche la division. Quelques aspects génétiques du cancer sont résumés dans la figure 7-26.

Ces exemples montrent comment plusieurs principes génétiques peuvent être mis en cause pour comprendre un seul problème particulier, dans le cas présent, un cancer. En l'occurence nous aurons utilisé comme concepts l'hérédité mendélienne, la dominance et la récessivité, l'analyse généalogique, le crossing-over mitotique et, bien sûr, la mutation, sujet de ce chapitre.

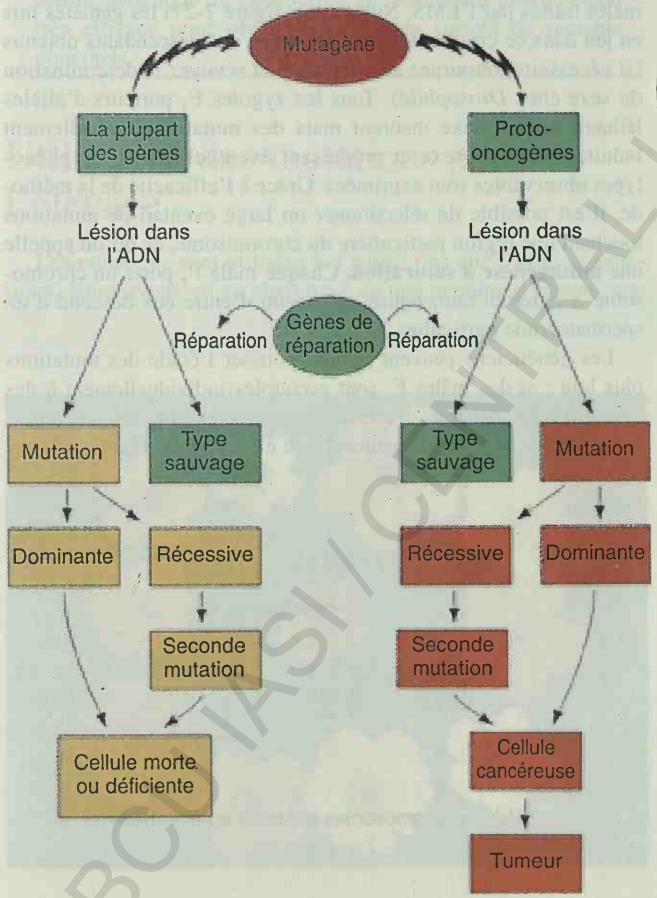


Figure 7-26. Comparaison des effets de mutations somatiques chez les proto-oncogènes et chez d'autres gènes.

Les mutagènes et l'analyse génétique

Les mutations sont extrêmement utiles sur le plan analytique. De la même manière que l'on pourrait comprendre le fonctionnement d'un moteur, en retirant, une par une, les pièces qui le constituent et en observant l'effet de ce retrait, on peut inactiver un par un les composants d'une cellule en induisant des mutations, et observer leurs effets sur le fonctionnement de la cellule. L'**analyse mutationnelle** est un autre aspect du processus que nous avons baptisé «dissection génétique des systèmes vivants».La première étape d'une telle analyse est la **recherche de mutants** dont l'emploi de mutagènes peut considérablement améliorer le rendement. Voyons quelques exemples.

Le tableau 7-5 montre les fréquences d'apparition de mutations *ad-3* chez *Neurospora* à la suite de traitements par différents mutagènes. En l'absence de traitement, il faut tester 2,5 millions de cellules pour trouver un mutant ! Par contre, après traitement à l'ICR-70 (une moutarde azotée), on peut isoler un mutant parmi 450 cellules survivantes. Le tableau 7-6 montre un autre exemple d'augmentation de la fréquence de mutants due à un agent mutagène approprié. Le terme **super-mutagène** est parfois utilisé pour qualifier ces agents puissants.

Le troisième exemple concerne la drosophile. Jusqu'au milieu des années '60, la plupart des chercheurs qui travaillaient sur *Drosophila* induisaient les mutations par les rayonnements. Des doses de 4.000 roentgens produisent des mutations létales dans 10 à 11% de l'ensemble chromosomes X des mâles irradiés. A des doses supérieures, la fertilité des mouches irradiées diminue, ce

BCU LAUSANNE / CENTRAL UNIVERSITY

Tableau 7-5. Fréquences de mutations provoquées par divers mutagènes chez *Neurospora.*

Mutagène utilisé	Temps d'exposition (minutes)	Survie (%)	Nombre de mutants *ad-3* par 10.6 survivants
Aucun (taux de mutation spontané)	—	100	≈0.4
Aminopurine (1-5mg/ml)	pendant la croissance	100	3
Ethyl méthane sulfonate(1%)	90	56	25
Acide nitreux (0.05M)	160	23	128
Rayons X (2000 r/min)	18	16	259
Methyl méthane sulfonate (20mM)	300	26	350
Rayons UV (600 ergs/mm² par min)	6	18	375
Nitrosoguanidine (25µM)	240	65	1500
Acridine moutarde ICR-170 (5 µg/mL)	480	28	2287

Note: Le test mesure la fréquence de colonies rouges *ad-3* parmi les colonies blanches de la souche sauvage ad^+.

qui est un sérieux inconvénient. De plus, les rayonnements induisent, outre des mutations ponctuelles, des remaniements chromosomiques qui peuvent compliquer l'analyse génétique.

L'éthyl-méthane-sulfonate (EMS), par contre, induit une proportion beaucoup plus importante de mutations ponctuelles. La substance peut être facilement administrée aux mouches adultes en les plaçant sur un filtre saturé d'une solution sucrée d'EMS. La simple ingestion provoque la formation d'un grand nombre de mutations. Des mâles, ayant reçu de l'EMS 0,025 molaire, produisent des spermatozoïdes dont 70 % des chromosomes X et pratiquement tous les chromosomes 2 et 3, portent une mutation létale. A un tel niveau de mutation induite, il est tout à fait possible de rechercher une série de mutations affectant un locus particulier ou un phénotype inhabituel, peu fréquent ou rare.

On peut déceler directement les chromosomes mutés au sein de la génération F_1, à condition qu'ils soient hémizygotes pour la région qui contient le locus d'intérêt. Les généticiens peuvent tester des chromosomes X de *Drosophila* de cette manière en croisant des femelles porteuses d'un chromosome X double et d'un chromosome Y (XX/Y). Le chromosome X double résulte de la fusion de deux chromosomes X, qui s'héritent comme un chromosome unique. Les femelles porteuses du X double sont croisées avec des mâles traités par l'EMS. Notez (voir figure 7-27) les gamètes mis en jeu dans ce croisement et le génotype des descendants obtenus (si nécessaire, retournez au chapitre 3 et revoyez la détermination du sexe chez *Drosophila*). Tous les zygotes F_1 porteurs d'allèles léthaux liés au sexe meurent mais des mutations nouvellement induites, liées au sexe et produisant éventuellement des phénotypes observables sont exprimées. Grâce à l'efficacité de la méthode, il est possible de sélectionner un large éventail de mutations touchant une région particulière du chromosome, ce qu'on appelle une **mutagénèse à saturation.** Chaque mâle F_1 porte un chromosome X paternel mutagénisé, et chacun d'entre eux descend d'un spermatozoïde particulier.

Les généticiens peuvent ensuite pousser l'étude des mutations plus loin : si des mâles F_1 sont accouplés individuellement à des femelles XX/Y, chaque descendant représentera un chromosome X «cloné». Les mouches F_1 peuvent être élevées à 22°C et des clones

Tableau 7-6. Efficacité de différents mutagènes chimiques sur la réversion de mutations *his*⁻ chez *Salmonella*

Mutagène	Révertants/nanomole	Rapport
1,2 epoxy-butane	0,0006	1
Chlorure de benzène	0,02	3
Méthyl-méthane sulfonate	0,63	105
2-naphtyl-amine	8,5	1.400
2-acétyl-amino-fluorène	108	18.000
Aflatoxine B_1	7.057	1.200.000
Furyl-furamide(AF-2)	20.800	3.500.000

SOURCE : J. McCann et B.N. Ames, dans *Advances in Modern Toxicology,* vol. 5. Edited by W.G. Flamm and M.A. Mehlman. Hemisphere Publishing Corp., 1976.

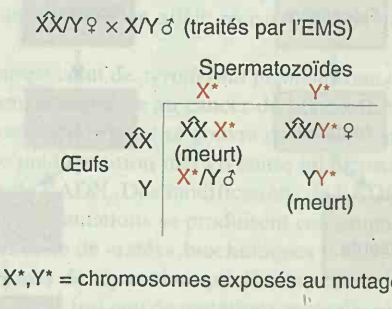


Figure 7-27. Utilisation du chromosome double X (XX) pour faciliter la récupération de mutations liées au chromosome X chez *Drosophila.* Du sperme traité par l'EMS ou par un autre mutagène, est utilisé pour fertiliser des œufs contenant soit le chromosome double-X, soit un chromosome Y. Le X des mâles traités se manifestera chez les fils hémizygotes, révélant le phénotype de la mutation récessive.

de croisements individuels, établis à 17°C et 29°C, permettront la détection directe de mutations thermo- ou cryosensibles. Les létaux thermosensibles représentent 10 à 12 % de toutes les mutations létales induites à l'EMS. Nous avons déjà parlé des avantages des mutations conditionnelles. De nombreux laboratoires testent de nos jours de manière routinière des stocks de *Drosophila* mutagénisées. Insistons sur le fait que cette approche n'est réalisable que grâce à la possibilité d'obtenir aisément un très grand nombre de mutants.

L'obtention de létaux ts a d'autre part l'avantage de simplifier la vie de l'expérimentateur. L'une de ses besognes consiste à trier les mâles et les femelles au cours des 12 heures qui suivent l'éclosion des pupes, afin d'éviter les accouplements non désirés (les jeunes mâles et femelles ne s'accouplent pas pendant les 12 (parfois 14) premières heures qui suivent l'éclosion). La pêche aux femelles vierges peut être avantageusement remplacée par l'utilisation de létaux ts (l^{ts}) de manière à produire à volonté des cultures unisexuées. Le croisement ♀XX/Y × ♂ l^{ts} /Y , par exemple, produira, à température permissive, une descendance des deux sexes. Si la culture est transférée à une température restrictive, les mâles l^{ts} / Y seront tués et seules les femelles écloront. De la même manière, l'homozygotie pour un caractère l^{ts} sur un chromosome XX ne produira que des mâles de type sauvage à la température restrictive.

Message Le mutagène EMS a accru considérablement la versatilité génétique de *Drosophila* en fournissant une méthode très efficace pour obtenir une grande variété de mutants ponctuels.

Utilisation des mutations pour l'élevage

Les mutations sont utilisées à d'autres fins que l'analyse génétique. Nous avons vu au chapitre 2 qu'une manière d'obtenir une variété plus performante de plantes de culture, est d'isoler un hybride et de sélectionner le recombinant désiré au sein de la descendance. Cette approche tire profit de la variation naturelle qui existe parmi les variétés déjà isolées ou qui poussent dans la nature. La figure 7-28 en montre un exemple. Mais on peut aussi induire la variabilité par traitement mutagène. Il s'agit alors d'une variabilité produite par intervention humaine.

On peut procéder de différentes manières. On peut mutagéniser le pollen avant pollinisation. Les mutations dominantes apparaîtront à la génération suivante. Les mutations récessives pourront être mises en évidence par autofécondation. On peut aussi mutagéniser les graines. Une cellule de l'embryon qu'elles renferment peut être atteinte, et devenir partie, soit d'un tissu germinal, soit d'un tissu somatique. Dans le dernier cas, toute mutation dominante se manifestera dans la plante dérivée de cette graine mais ce sera là la fin du voyage pour cette mutation. Une mutation dans un tissu germinal, par contre, se manifestera au sein des générations suivantes, ce qui permettra de sélectionner les mutants désirés. La figure 7-29 résume la manière de procéder pour tirer profit des mutations afin de sélectionner de nouvelles variétés.

Dans ce chapitre, nous avons passé en revue l'intérêt biologique des mutations géniques, non seulement en tant que telles, mais encore pour toute une série d'applications pratiques et expérimentales. Nous allons maintenant voir que les mutations chromosomiques sont elles aussi d'un grand intérêt.

Figure 7-28. Fleurs provenant de différentes variétés horticoles de *Potentilla fruticosa* disposées en cercle (type sauvage au centre). Toute ces variations séduisantes de forme, de couleur ou de taille sont le résultat de mutations identifiées et perpétuées par les horticulteurs. La plupart des plantes à fleur de nos jardins et de nos parcs et la plupart de nos plantes alimentaires ont une origine similaire, qu'il s'agisse de mutations spontanées ou induites. (Anthony Griffiths).

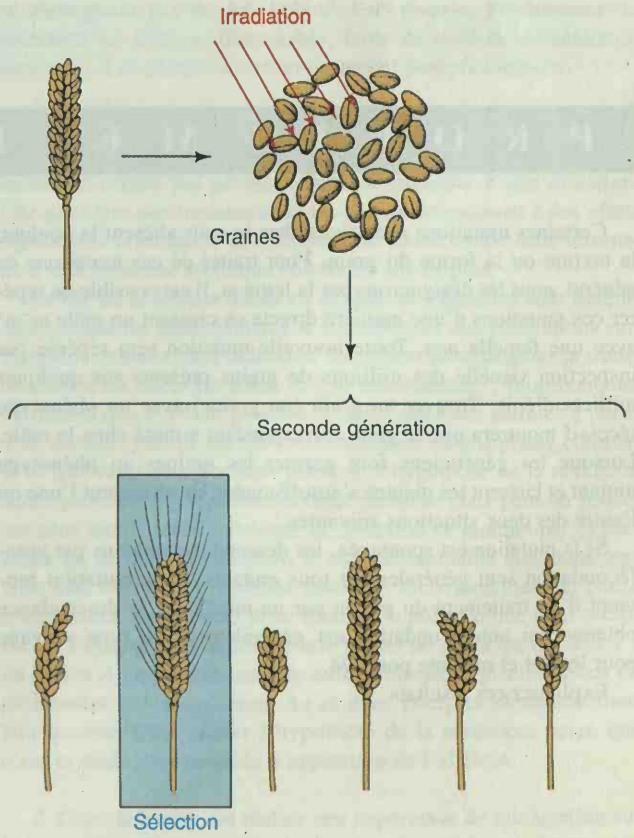


Figure 7-29. Utilisation de mutations pour l'amélioration de plantes agricoles. (D'après Björn Sigurbjörnsson, «Induced Mutations in plants». *Scientific American*, 1970).

RÉSUMÉ

Les mutations géniques peuvent apparaître soit dans les cellules somatiques, soit dans les cellules germinales. Dans ces deux catégories, on trouve différents types de mutations, y compris des mutations morphologiques, létales, conditionnelles, biochimiques et de résistance à divers agents.

Les mutations peuvent être utilisées pour étudier le mécanisme de la mutagénèse, ou pour disséquer génétiquement l'une ou l'autre fonction biologique. Pour mener à bien de telles études, il faut cependant disposer d'un système de détection des allèles mutants au niveau phénotypique. Dans les diploïdes, les mutations dominantes sont facilement décelables ; par contre, les mutations récessives ne se manifestent pas au niveau du phénotype. C'est la raison pour laquelle les systèmes de détection sont beaucoup plus aisés à mettre au point pour les organismes haploïdes où la question de la dominance ne se pose pas.

Comme les mutations spontanées sont rares, les généticiens font appel à des systèmes de sélection ou à des mutagènes (ou aux deux) pour obtenir les mutations désirées. Les systèmes de sélection permettent de distinguer immédiatement un mutant d'un non-mutant. Les mutagènes sont précieux pour l'étude des mécanismes d'apparition des mutations, mais aussi pour induire les mutations nécessaires aux analyses génétiques. Enfin, les mutagènes sont souvent utilisés dans les sélections de plantes de cultures.

Diagramme conceptuel

Tracez un diagramme conceptuel reliant le plus grand nombre possible des termes suivants. Notez que ceux-ci sont mentionnés dans un ordre quelconque.

mutation/allèle/réversion/type sauvage/récessif/somatique/mutagène/germinal/dissection génétique/descendance

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Certaines mutations récessives chez le maïs altèrent la couleur, la texture ou la forme du grain. Pour traiter de ces mutations en général, nous les désignerons par la lettre *m*. Il est possible de repérer ces mutations d'une manière directe en croisant un mâle m^+m^+ avec une femelle *mm*. Toute nouvelle mutation sera repérée par inspection visuelle des millions de grains présents sur quelques milliers d'épis. Trouver un grain (ou graine) avec un phénotype récessif montrera que le gène correspondant a muté chez le mâle. Lorsque les généticiens font germer les graines au phénotype mutant et laissent les plantes s'autoféconder, ils observent l'une ou l'autre des deux situations suivantes :

Si la mutation est spontanée, les descendants obtenus par autofécondation sont généralement tous mutants. Si la mutation provient d'un traitement du pollen par un mutagène, la descendance obtenue par autofécondation est généralement du type sauvage pour les 3/4 et mutante pour 1/4.

Expliquez ces résultats.

Solution

Comme d'habitude nous allons voir que le fait de reformuler les résultats d'une manière légèrement différente va nous fournir les indices nécessaires pour trouver la solution. La différence entre les deux types de résultats semble refléter une différence entre mutations spontanées et induites. A partir d'une mutation spontanée nous obtenons un individu qui semble être de génotype *mm* parce qu'il se comporte comme un membre de lignée pure pour le phénotype mutant. A partir d'une mutation induite nous obtenons un individu qui semble, au vu du rapport 3 : 1, être de génotype m^+m. Il est clair que cette déduction n'est pas en accord avec le fait que son phénotype est mutant. Le cas est donc paradoxal. Comment une graine peut-elle avoir un phénotype mutant récessif et donner une plante produisant une descendance typique d'un hétérozygote ?

La leçon de cet exemple est que l'expérimentateur doit toujours garder présentes à l'esprit les particularités de l'organisme utilisé. Qu'en est-il du maïs qui doive ici retenir notre attention ? En fait, tout repose sur des événements mutationnels qui se produisent soit au sein des grains de pollen dans les anthères soit dans leur voisinage immédiat. Rappelons-nous (chapitre 3, figure 3-40) que le grain de pollen mûr du maïs n'est pas une seule cellule pourvue d'un noyau haploïde mais qu'il est constitué de trois éléments : le noyau haploïde du tube pollinique et deux autres noyaux haploïdes qui jouent un rôle équivalent à celui des spermatozoïdes. L'un de ces derniers fusionnera avec un noyau femelle pour former le zygote et l'autre avec deux autres noyaux femelles pour former l'endosperme triploïde. Lorsque les grains de pollen mûrs sont traités par un mutagène, il est probable que l'un des noyaux spermatiques seulement mutera dans un grain donné ; les seules mutations que nous verrons seront celles qui atteignent le noyau qui prend part à la formation de l'endosperme, parce que c'est ce dernier qui forme la masse du grain mûr. La solution à notre problème est là mais formulons la en écrivant les génotypes : l'endosperme doit être *mmm* et l'embryon *m*⁺*m*. Voilà pourquoi l'autofécondation produit un rapport 3 : 1.

Qu'en est-il des mutations spontanées ? Un gène peut muter à n'importe quel moment. Il s'écoule relativement peu de temps entre la mitose qui produit les trois noyaux d'un grain de pollen mûr et la fécondation. Il est donc probable qu'une mutation produisant un allèle *m* se produira pendant la période relativement longue qui précède la maturation du grain de pollen ce qui aura pour effet que ce dernier contiendra trois noyaux de génotype *m*. Lorsqu'une telle cellule féconde un gamète de la femelle *mm*, l'endosperme est *mmm* et l'embryon *mm*.

En résumé, nous avons utilisé des concepts définis dans ce chapitre lors de la discussion des mutations somatiques et germinales, et lors de la description des systèmes de détection ; nous avons emprunté à d'autres chapitres nos connaissances sur les relations de dominance, la génétique mendélienne, la mitose, la méiose et la biologie des organes reproducteurs.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Une certaine espèce de plante contient de l'anthocyane, un pigment pourpre, dispersé dans la totalité de la plante. De ce fait, les parties normalement vertes apparaissent marron (vert + violet), et les parties telles que la fleur, qui ne contiennent pas de chlorophylle (les pétales, les ovaires et les anthères) sont pourpres. Le gène A est essentiel à la production d'anthocyane et, à l'état homozygote, les allèles récessifs *a* donnent des plantes dépourvues d'anthocyane. Le nouvel allèle instable, appelé a^u, est apparu. Il réverse vers le type sauvage *A* à une fréquence mille fois supérieure à celle observée pour les allèles *a* usuels (stables).

a. Quel phénotype trouvera-t-on chez des plantes de génotype (1) a^ua^u ; (2) a^ua ; (3) Aa^u ?

b. Comment pouvez-vous confirmer que les soit-disant réversions sont de vraies mutations ?

Solution

a. (1) Nous avons vu que les mutations sont généralement très rares ; le plus souvent, elles passent inaperçues si on ne les cherche pas délibérément. Cependant, un allèle qui réverse à une fréquence aussi élevée que a^u risque de manifester sa présence de manière ostensible, à condition qu'un système de détection approprié soit disponible. Dans les tissus somatiques d'une plante constituée de millions de cellules, de nombreuses cellules seront le siège d'une réversion de a^u vers *A*. Au cours du développement, chacune de ces cellules donnera un clone de cellules révertantes, clones qui se manifesteront en tant que secteurs pourpres ou marron. La plante de génotype a^ua^u montrera donc des pétales blancs décorés de secteurs pourpres de taille variable, et des tissus photosynthétiques verts, tachés de marron.

(2) Chaque secteur est un clone dérivé d'une cellule où s'est produite une réversion $a^u \rightarrow A$. On s'attend à ce que l'allèle a^u soit dominant sur *a*, parce que *a* étant inactif, il n'a aucune raison d'empêcher a^u de réverser. Par conséquent, une plante a^ua aura le même phénotype qu'une plante a^ua^u, mais avec moins de secteurs, parce qu'il y a moitié moins de chances de réverser lorsqu'il n'y a qu'un seul allèle a^u.

(3) Vu que *A* produit du pigment dans toutes les cellules, Aa^u ne se distinguera pas de *AA*. Même si a^u réverse, l'événement de réversion ne sera pas discernable, faute de système de détection approprié. Les plantes seront entièrement pourpres-marron.

b. Comment prouver qu'un secteur pigmenté est effectivement du à une mutation ? Il faut mentionner ici le fait que la présence de taches ne reflète pas nécessairement la présence d'une mutation. Elle peut être due (comme chez les chiens dalmatiens) à des effets régulateurs affectant le développement. Etant donné cette alternative, une personne sceptique voudra en savoir plus.

La clé du problème réside en ce que les mutations sont héréditaires et que les gènes mutants se transmettent aux générations suivantes de cellules ou d'individus. Comment donc détecter la transmission d'un allèle révertant *A* à la descendance ? Intuitivement, on réalise que s'il était possible d'isoler quelques cellules à partir d'un secteur, puis de les faire se développer en une plante complète et que cette dernière était pourpre, l'hypothèse de la réversion serait prouvée. C'est techniquement possible mais peut-on procéder plus simplement ? Puisque la réversion se marque par la présence de secteurs sur la fleur, il est vraisemblable que, dans certains cas, les tissus germinaux (anthères ou ovaires) fassent partie d'un secteur. On pourrait donc récolter le pollen d'une fleur sectorée, et l'utiliser pour féconder une plante de génotype *aa*. S'il y a du pollen *A* et que l'on analyse suffisamment de plantes issues du croisement, certaines seront *Aa* et donc pourpres et marron dans leur totalité. Ceci prouve l'hypothèse de la réversion, parce que c'est la seule voie possible d'apparition de l'allèle *A*.

2. Chez la levure, on réalise une expérience de mutagénèse sur le locus *tryp4*. Une mutation dans ce locus confère une auxotrophie pour l'acide aminé tryptophane. L'allèle *tryp4-1*, du locus *tryp4*, est connu pour sa haute fréquence de réversion. Dans l'expérience

en question, on a mesuré la fréquence de réversion dans une population de cellules haploïdes. Une culture de levure de type conjugant α et de génotype *tryp4-1* titrant 10 millions de cellules, a été étalée sur un milieu sans tryptophane ; 120 colonies se sont développées. Le génotype de ces colonies a été vérifié en les croisant avec une culture de type sauvage et de type conjugant α. Les résultats de ce croisement ont montré que les colonies testées étaient de deux types : deux tiers de type 1 et un tiers de type 2 :

Type 1 α × type sauvage a ⟶
descendance entièrement tryptophane indépendante

Type 2 α × type sauvage a ⟶
$\frac{3}{4}$ de la descendance tryptophane indépendante
$\frac{1}{4}$ de la descendance tryptophane dépendante.

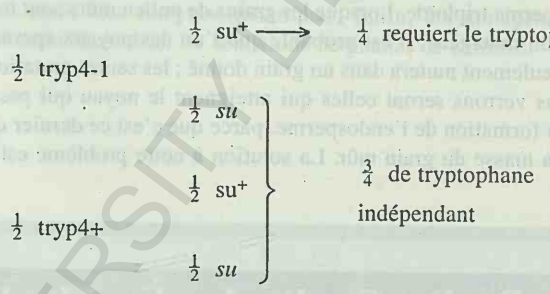
a. Proposez une explication génétique pour l'apparition de ces deux types.

b. Calculez la fréquence de réversion.

Solution

a. L'étalement sur un milieu sans tryptophane devrait être un système de sélection des révertants *tryp4*$^+$, qui ne nécessitent pas de tryptophane pour pousser. Recroisées avec un type sauvage (*tryp4*$^+$), de telles colonies devraient fournir une descendance entièrement tryptophane indépendante. C'est le comportement qu'ont les colonies de type 1 qui sont donc des révertants *tryp*$^+$.

Voyons maintenant ce qu'il en est des colonies de type 2. Le fait qu'une partie de leur descendance requiert le tryptophane montre que la mutation *tryp4-1* n'a pas simplement réversé. Il semble plutôt que le phénotype d'auxotrophie pour le tryptophane ait été masqué, ou supprimé. Nous avons déjà vu des exemples de suppression d'une mutation par une autre mais ici, l'existence d'un rapport 3/1 dans un organisme haploïde nous montre à elle seule que deux loci indépendants sont en jeu. Désignons la mutation suppresseur par *su*, et son allèle sauvage inactif par *su*$^+$. Les colonies de type 2 ont alors le génotype *tryp4-1 su*, et celles de type sauvage le génotype *tryp4*$^+$ *su*$^+$. En croisant ces deux types de colonies, on obtient :



(Notez que *su* n'a pas d'effet sur l'allèle *tryp4*$^+$.)

b. Nous savons d'après l'énoncé, que deux tiers des colonies sont de type 1, c'est-à-dire des révertants vrais. Il y a donc 120 × 2/3 = 80 révertants pour un total de 10^7 colonies, soit une fréquence de réversion de 8×10^{-6} cellules.

PROBLÈMES

1. Soit une espèce de fleur à pétales bleus. La mutation *w* produit des pétales blancs. Dans une plante de génotype *ww*, un simple événement de réversion se produit durant le développement d'un pétale. Sous quelle forme cet événement pourra-t-il être détecté sur ce pétale ?

2. *Penicillium* (un champignon filamenteux utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour produire la pénicilline et ses dérivés) peut normalement synthétiser l'acide aminé leucine. Comment procéderiez-vous pour isoler des mutants auxotrophes pour la leucine ? (REMARQUE : Comme beaucoup de champignons filamenteux, *Penicillium* produit des spores asexuées à profusion.)

3. Comment sélectionner des révertants de mutants *pro-1* de levure ? (Cette mutation confère l'auxotrophie pour l'acide aminé proline, qui est synthétisé par les souches sauvages et est nécessaire à la croissance.)

4. Comment tireriez-vous profit de la technique de réplique sur velours pour isoler des mutants arginine-dépendants à partir de levures haploïdes ?

5. En utilisant la technique d'enrichissement par filtration, vous faites vos filtrations à partir de cultures en milieu minimum, et vous étalez finalement les organismes sur un milieu complet qui contient tous les additifs nutritionnels connus. Comment identifieriez-vous un additif spécifique requis par un mutant particulier ? Par la technique des répliques, les tests sur des milieux contenant l'un ou l'autre de tous les additifs connus à ce jour ne vous ont pas permis d'identifier celui qui est requis par l'un des mutants. Comment expliquez-vous ce résultat ?

6. Dans une expérience visant à mesurer le taux de réversion d'un allèle mutant *ad-3* dans les cellules haploïdes de levure, 100 tubes contenant un milieu sans adénine sont inoculés avec un petit nombre de cellules et incubés jusqu'à obtention de 10^6 cellules chacun. Le contenu de chaque tube est alors étalé sur une boîte de milieu ne contenant pas d'adénine. Les boîtes sont analysées après 24 heures : 63 d'entre elles contiennent des colonies. Calculez le taux de réversion de cet allèle par division cellulaire.

7. Vous désirez déterminer si la caféine induit des mutations chez les organismes supérieurs. Comment procéderiez-vous expérimentalement ? N'omettez pas d'inclure les contrôles !

8. Chez le maïs, la présence (*Wx*), ou l'absence (*wx*), d'amylose dans l'amidon cellulaire est déterminée par un seul gène. Les cellules contenant l'allèle *Wx* sont colorées en bleu par l'iode, les

wx en rouge. Echafaudez un système qui permette d'étudier l'apparition de mutations (rares) $Wx \rightarrow wx$, sans nécessiter des hectares de culture. (SUGGESTION : Pensez à un type cellulaire facile à étudier.)

9. Vous croisez une souris mâle unique d'un stock sauvage homozygote avec une série de souris femelles vierges, homozygotes pour l'allèle déterminant un pelage de couleur noire. La descendance F_1 est constituée de 38 souris de type sauvage (mâles ou femelles en proportions équivalentes), et de souris noires (même remarque). Comment expliquer ce résultat ?

10. Après avoir longtemps travaillé dans une centrale nucléaire, un homme devient père d'un garçon hémophile : c'est le premier cas recensé dans les généalogies des parents. Un autre homme, travaillant dans la même usine, devient père d'un enfant nain achondroplasique, là encore, un cas unique dans les familles des deux parents. Les deux pères intentent un procès à leur employeur. En tant que généticien, vous êtes amené à témoigner au procès. Que direz-vous de chaque cas ? (Notez que l'hémophilie est une mutation récessive liée au X, l'achondroplasie une mutation autosomale dominante.).

11. Dans la maternité d'un grand hôpital de Copenhague, il y a eu 94.075 naissances. Dix enfants étaient nains achondroplasiques (l'achondroplasie est une mutation autosomale dominante montrant une pénétrance quasi totale). Deux seulement de ces enfants nains avaient des parents nains. Quelle est la fréquence de mutation vers l'achondroplasie dans les gamètes ? Avez-vous à vous préoccuper de la fréquence de réversion dans ce problème ? Expliquez.

12. L'une des tâches de la commission chargée d'examiner les dommages causés aux victimes de la bombe d'Hiroshima-Nagasaki, est d'évaluer les conséquences génétiques de l'explosion. Une des premières choses étudiées était le rapport des sexes dans la descendance des survivants. Pourquoi pensez-vous que la commission a procédé de la sorte ?

13. Chez nombre d'organismes, on trouve des exemples d'allèles récessifs instables qui réversent vers le type sauvage à des fréquences variables. Souvent, des allèles instables différents réversent de manière différente. Un gène de maïs (*C*), qui produit un pigment rouge dans le grain, a plusieurs allèles instables du type nul. L'un d'entre eux, c^{m1}, réverse durant une étape tardive du développement de la graine, et réverse à haute fréquence. L'allèle c^{m2}, lui, réverse lors d'une étape plus précoce et à une fréquence plus basse. En tenant compte de ce que l'absence de pigment se marque par un phénotype jaunâtre, quel phénotype prédiriez-vous pour des plantes de génotype :

a. $C\ c^{m1}$
b. $C\ c^{m2}$
c. $c^{m1}\ c^{m1}$
d. $c^{m2}\ c^{m2}$
e. $c^{m1}\ c$ (*c* est un allèle mutant stable)
f. $c^{m2}\ c$
g. $c^{m1}\ c^{m2}$

14. Une souche haploïde d'*Aspergilus nidulans* portait une mutation auxotrophe *met-8* conférant une exigence pour la méthionine. Après étalement de plusieurs millions de spores asexuées sur un milieu miimum deux colonies prototrophes se développèrent. Celles-ci furent isolées puis croisées sexuellement avec deux souches différentes, ce qui produisit les descendances représentées dans le tableau suivant, où met^+ signifie «méthionine non requise pour la croissance» et met^- «méthionine requise».

	Croisement avec une souche sauvage	Croisement avec une souche porteuse de l'allèle original *met-8*
Prototrophe 1	Tous met^+	1/2 met^+ 1/2 met^-
Prototrophe 2	3/4 met^+ 1/4 met^-	1/2 met^+ 1/2 met^-

a. Expliquez l'origine des deux prototrophes
b. Expliquez les résultats des quatre croisements en utilisant des symboles génétiques bien définis.

Décomposons le problème

Avant d'essayer de résoudre ce problème considérez les questions suivantes qui concernent toutes le système expérimental en question.

a. Faites un schéma décrivant l'expérience; indiquez-y les tubes à essai, les boîtes etc...
b. Définissez tous les termes génétiques utilisés.
c. Plusieurs énoncés mentionnent un numéro à côté du symbole de l'auxotrophie-ici le numéro *8* à côté de *met*. Que signifie ce numéro? Faut-il le savoir pour résoudre le problème?
d. Combien de croisements furent-ils effectués? Lesquels?
e. Représentez les croisements par des symboles génétiques.
f. La question concerne-t'elle une mutation somatique ou germinale?
g. S'agit-il d'une nouvelle mutation ou d'une réversion?
h. Pourquoi si peu de colonies prototrophes sont-elles apparues sur la boîte?
i. Pourquoi les millions de spores asexuées n'ont-elles pas poussé?
j. Pensez-vous qu'elles soient mortes?
k. Pensez-vous que le type sauvage utilisé dans les croisements était prototrophe ou auxotrophe? Expliquez.
l. Si vous faisiez croître les deux prototrophes et le type sauvage dans des tubes différents, pourriez-vous les identifier à leur seul aspect?
m. Comment pensez-vous que la mutation *met-8* fut obtenue? (Expliquez celà par un schéma; rappelez-vous qu'*Asper-*

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

gillus est un champignon filamenteux).

n. Au chapitre 6 nous avons vu qu'*Aspergillus* convient bien pour étudier le crossing-over mitotique et l'haploïdisation. Pensez-vous que ces phénomènes soient impliqués dans ce problème? Peut-on les écarter comme explications des résultats?

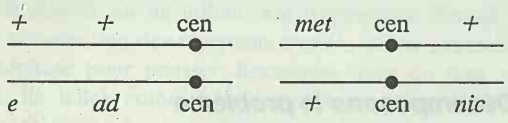
o. Quelle descendance attendez-vous d'un croisement entre *met-8* et le sauvage? Entre *met-8* et *met-8?* Entre sauvage et sauvage?

p. Pensez-vous qu'il s'agisse ici d'une analyse globale de la descendance méiotique ou d'une analyse de tétrades?

q. Retracez un schéma simple pour le cycle de vie d'un haploïde en indiquant le stade où la méiose intervient.

r. Considérez le rapport 3/4:1/4. Chez les haploïdes les croisements hétérozygotes pour un gène donnent généralement des rapports de descendance impliquant des moitiés. Comment arriverait-on à des rapports jouant sur des quarts?

15. Une souche diploïde de levure était hétérozygote pour plusieurs gènes comme indiqué ci-dessous:



L'allèle récessif *e* donne une cellule allongée, oviforme plutôt que ronde et l'allèle récessif *ad* (exigence pour l'adénine) provoque l'accumulation d'un pigment rouge en condition de limitation par l'adénine (le type sauvage est blanc). Les allèles *met* et *nic* sont des marqueurs d'auxotrophie récessifs qui servent à sélectionner la condition diploïde permettant de croître en milieu minimum. *Cen* représente «centromère». La culture de départ était blanche et croissait bien sur milieu minimum sans produire de pigment rouge. Les cellules furent alors irradiées puis étalées sur un milieu limitant en adénine. Plusieurs phénotypes apparurent sur les boîtes:

a. La plupart des colonies étaient blanches.

b. Plusieurs colonies diploïdes rouges apparurent. Après examen au microscope il apparut que:

(1) La plupart des colonies étaient composées de cellules rondes.

(2) Certaines étaient composées de cellules allongées.

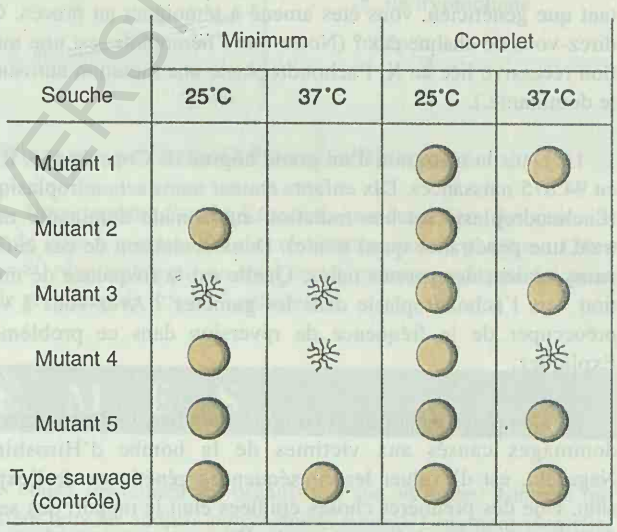
c. De nombreuses cellules parmi celles étalées ne se développèrent pas en colonies. Certaines furent transférées sur un milieu complet contenant de l'extrait de levure (contenant toutes les substances nutritives possibles).

(1) Certaines se développèrent en colonies.

(2) D'autres non.

Quelles sont les explications les plus probables pour l'origine de ces cinq types de cellule?

16. Des cellules d'une souche sauvage et haploïde de *Neurospora* ont été mutagénisées par l'EMS. Un grand nombre de ces cellules fut alors étalé sur des boîtes et mis à croître pour produire des colonies sur milieu complet (contenant toutes les substances nutritives possible) à 25°C. Ces boîtes servirent alors à faire des répliques sur milieu minimum et complet, à 25°C et 37°C. Plusieurs phénotypes apparurent ainsi que le représente le schéma ci-dessous. Les cercles représentent une croissance abondante, les petites colonies filamenteuses une croissance faible et les vides une absence totale de croissance. Comment décriviez-vous les catégories auxquelles appartiennent les mutants 1 à 5?



17. a. Vous avez isolé trois mutants exigeant le tryptophane à partir d'un champignon haploïde. Vous les croisez par paires et examinez par croisement 1000 spores pour la capacité de se développer en absence de tryptophane.

Croisement	Parents	Trp^+/1000
1	A × B	135
2	A × C	179
3	B × C	50

Que pouvez-vous conclure de ces résultats?

b. Vous faites poussez des cultures à partir de cinq des spores exigeant le tryptophane du croisement 2 (vous les marquez 2-1, 2-2, etc...), et vous faites croître chacune de ces cultures avec le mutant original B. De nouveau vous examinez 1000 spores de chaque croisement pour la capacité de croître sans tryptophane.

BCU IA / CENTRALE UNIVERSITAIRE LIBRARY

Croisement	Parents	Trp$^+$/1000
4	2-1 × B	132
5	2-2 × B	13
6	2-3 × B	53
7	2-4 × B	137
8	2-5 × B	47

Que pouvez-vous conclure concernant chacune des souches 2-1, 2-2 etc...? Donner le génotype de chacune souche et expliquez son origine.

(Problème 17 de Rosie Redfield).

18. Pour comprendre la base génétique de la locomotion chez le nématode diploïde *Caenorhabditis elegans*, des mutations récessives furent isolées; leur phénotype était convulsif, donc différent du glissement souple du sauvage. Ces mutations devaient sans doute affecter le système nerveux ou musculaire. Douze mutants homozygotes furent croisés entre eux et les hybrides examinés pour le caractère convulsif. Les résultats suivants furent obtenus, les signes + et t, désignant respectivement des hybride ou phénotype sauvage et convulsif:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	t	+	+	+	t	+	+	+	+	+	+	+
2		t	+	+	+	t	+	t	+	t	+	+
3			t	t	+	+	+	+	+	+	+	+
4				t	+	+	+	+	+	+	+	+
5					t	+	+	+	+	+	+	+
6						t	+	t	+	t	+	+
7							t	+	+	+	t	t
8								t	+	t	+	+
9									t	+	+	+
10										t	+	+
11											t	t
12												t

a. Expliquez le but de ces croisements.

b. Combien de gènes affectant le mouvement, ont-ils ainsi été identifiés et quel gène est-il affecté par quelle mutation? Utilisez des symboles de votre choix pour chaque gène.

c. A titre d'exemples donnez les génotypes des mutants 1,2 et 5, ainsi que des hybrides 1/5 et 1/2, en vous servant des symboles définis en b) et expliquez pourquoi les résultats obtenus avec ces deux hybrides sont différents.

19. Notez que ce problème nécessite la connaissance du code génétique (voyez la figure 13-18). Chez le maïs la synthèse d'un pigment pourpre est contrôlée par deux gènes agissant séquentiellement via des intermédiaires non colorés («blancs»):

$$\text{blanc 1} \xrightarrow[\text{gène A}]{} \text{blanc 2} \xrightarrow[\text{gène B}]{} \text{pourpre}$$

Des mutations non-sens UAG ont été obtenues dans les gènes A et B; appelons-les a^n et b^n. Les deux mutants étaient dépourvus d'activité enzymatique et se montraient récessifs vis-à-vis de leurs allèles sauvages A et B. Une mutation non-sens est produite par une substitution de nucléotide qui transforme un codon en codon non-sens; dans le cas présent il s'agit du même dans les deux cas: UAG. Un suppresseur de non-sens était également disponible; en l'occurrence il s'agissait d'une mutation affectant une copie dupliquée d'un gène d'ARNt. La mutation touche l'anticodon, ce qui amène l'ARNt à insérer l'acide aminé tryptophane au codon non-sens UAG, permettant ainsi à la machinerie de synthèse des protéines de poursuivre et compléter la lecture du messager. Représentons l'allèle suppresseur de non-sens par T^s et son allèle sauvage par T^+ ; ni T^s ni T^+ n'exerce d'effet détectable sur les allèles sauvages A et B ou sur un autre aspect de leur phénotype.

a. Vous attendriez-vous à ce que T^s soit domminant sur T^+ ou non? Expliquez.

b. Un trihybride $Aa^nBb^nT^sT^+$ est autofécondé. Si tous ces gènes sont non liés, quel rapport phénotypique vous attendez-vous à retrouver dans la descendance? Expliquez (supposez que l'absence du pigment pourpre donne une teinte pâle que nous appellerons «blanche»).

20. Décrivez très précisément les étapes par lesquelles vous procéderiez pour déterminer le locus chromosomique d'une nouvelle mutation récessive que vous venez de découvrir chez la tomate. Décrivez les croisements à mettre en oeuvre, les lignées à utiliser, comment vous obtiendriez ces dernières, dites de quelle superficie de champs ou de serre vous avez besoin et combien de temps prendront les expériences. (Vous pouvez vous reporter à la carte génétique de la tomate, représentée sur la figure 5-15).

21. Une souche de *Neurospora* incapable de synthétiser l'arginine produit une colonie révertante, ne dépendant donc plus de l'arginine pour croître. Vous faites un croisement entre ce révertant et le sauvage. Quelle proportion de la descendance de ce croisement sera indépendante de l'arginine si

a. la réversion consiste en un retour au type sauvage qui a produit la mutation ?

b. le phénotype révertant est du à une mutation dans un deuxième gène situé sur un chromosome différent ? (c'est-à-dire si la mutation réverse est un suppresseur de la mutation arg^-) ?

c. une mutation suppresseur est survenue dans un deuxième gène situé à 10 unités de topographie génétique de la mutation arg^- ?

22. Un certain champignon haploïde est normalement de couleur rouge à cause d'un pigment caroténoïde. Divers mutants de couleurs différentes ont été obtenus : orange (o^-), rose (p^-), blanc

BCU Lausanne / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(*w*-), jaune (*j*$^-$) et beige (*b*$^-$). Chacun de ces phénotypes est hérité comme s'il était dû à une seule mutation. Pour élucider la nature des fonctions affectées par ces mutations on combine ces dernières en mutants doubles ; les résultats sont les suivants :

	p-	*w*-	*y*-	*b*-
o-	rose	blanc	jaune	beige
p-	-	blanc	rose	rose
w-		-	blanc	blanc
y-			-	jaune

A titre d'exemple un mutant *o*$^-$*p*$^-$ est rose, *o*$^-$*w*$^-$ blanc etc

a. Comment expliquez-vous ces résultats ?
Fournissez une interprétation détaillée.

b. Quels phénotypes obtiendriez-vous si vous appariez les mutants en hétérokaryotes ?
Pensez à toutes les combinaisons possibles.

c. Quelles proportions relatives de phénotypes observeriez-vous dans la descendance d'un croisement entre un double mutant *o*$^-$*p*$^-$ et le sauvage si les deux mutations sont à 16 unités l'une de l'autre ?

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

8

Les mutations chromosomiques I : altérations de la structure des chromosomes

Translocation réciproque mise en évidence par une technique de coloration des chromosomes. Une suspension de chromosomes extraits de nombreuses cellules est triée d'après leur taille grâce à un dispositif électronique. L'ADN est alors extrait de certains de ces chromosomes puis lié à une substance fluorescente et enfin ajouté à une préparation de chromosomes partiellement dénaturés sur une lame porte-objet. L'ADN fluorescent retrouve par complémentarité le chromosome identique à celui dont il est issu et le colore sur toute sa longueur. Dans cette préparation des substances fluorescant respectivement en bleu clair et en rose ont été utilisées afin de pouvoir reconnaître des chromosomes différents. La préparation fait apparaître un chromosome normal en rose, un autre en bleu, et deux chromosomes ayant échangé leurs extrémités. (Laboratoire Lawrence Berkeley).

CONCEPTS-CLÉS

- Les chromosomes présentent de nombreux repères qui permettent de détecter certains remaniements de leur structure.
- Comme les régions homologues manifestent une grande affinité réciproque pendant la méiose, les cellules diploïdes qui contiennent un jeu de chromosomes normaux et un jeu remanié produisent des structures d'appariement qui présentent une forme et des caractéristiques propres au remaniement considéré.
- Une délétion survenant dans un jeu de chromosomes est généralement nocive parce qu'elle peut déséquilibrer la constitution génétique et démasquer des allèles défavorables présents dans le jeu complémentaire.
- Une duplication peut déséquilibrer le génome mais aussi permettre aux copies d'un même gène d'évoluer de manière divergente.
- A l'état hétérozygote, une inversion diminue la fertilité et réduit la fréquence de recombinaison dans la région affectée par l'inversion.
- A l'état hétérozygote, une translocation provoque la semi-stérilité et fait apparaître une liaison entre des gènes initialement présents sur des chromosomes différents.

DUKE UNIVERSITY LIBRARY

Le terme de mutation chromosomique est réservé aux processus qui soit provoquent des remaniements (ou réarrangements) dans la structure de certains chromosomes, soit modifient le nombre d'exemplaires de l'un ou l'autre chromosome voire celui de jeux entiers de chromosomes. Tout comme pour les mutations de gènes, l'appellation désigne aussi bien le processus que son résultat, de sorte que tout réarrangement de génome venant à survenir peut être qualifié de mutation chromosomique. Il est parfois possible de repérer ces modifications génomiques au microscope, quand ce n'est pas par l'analyse génétique seule. Par contre il n'est pas possible de détecter les mutations de gènes au microscope : un chromosome porteur d'une telle mutation y présente le même aspect qu'un homologue porteur de l'allèle sauvage.

Bien des mutations chromosomiques provoquent des anomalies dans le fonctionnement des cellules ou de l'organisme entier. Il y a essentiellement deux raisons à cela. Tout d'abord, les mutations chromosomiques peuvent être la cause d'anomalies du fait qu'elles modifient le nombre de copies de certains gènes ou leur position. Ensuite, si la mutation implique la rupture d'un chromosome, comme c'est souvent le cas, cette rupture peut se produire à l'intérieur même d'un gène, ce qui provoque une altération fonctionnelle.

Pour le biologiste, les mutations chromosomiques revêtent de l'importance à plus d'un titre. En premier lieu elles fournissent au chercheur un mécanisme qui produit des arrangements particuliers de gènes, permettant de résoudre certains problèmes biologiques. En deuxième lieu, ces mutations se révèlent importantes sur le plan appliqué, tout particulièrement en médecine mais aussi pour l'amélioration génétique des plantes et des animaux. Enfin, les mutations chromosomiques ont joué un rôle important dans la formation des génomes au cours de l'évolution.

L'étude des jeux de chromosomes, normaux ou anormaux, et de leur propriétés génétiques, est appelée **cytogénétique**, une discipline qui combine la cytologie avec la génétique. La cytogénétique utilise le génome normal comme référence, encore appelé type sauvage. Tout cytogénéticien doit se familiariser

Tableau 8-1. Les chromosomes de l'Homme

Groupe	Numéro	Schéma	Longueur relative*	Index centromérique†
Chromosomes de grande taille				
A	1		8,4	48 (M)
	2		8,0	39
	3		6,8	47 (M)
B	4		6,3	29
	5		6,1	29
Chromosomes de taille moyenne				
C	6		5,9	39
	7		5,4	39
	8		4,9	34
	9		4,8	35
	10		4,6	34
	11		4,6	40
	12		4,7	30
D	13		3,7	17 (A)
	14		3,6	19 (A)
	15		3,5	20 (A)
Chromosomes de petite taille				
E	16		3,4	41
	17		3,3	34
	18		2,9	31
F	19		2,7	47 (M)
	20		2,6	45 (M)
G	21		1,9	31
	22		2,0	30
Chromosomes sexuels				
	X		5,1 (groupe C)	40
	Y		2,2 (groupe G)	27 (A)

* En pourcent de la longueur totale d'un jeu haploïde de 22 autosomes.

† Longueur du bras le plus court en pourcent de la longueur du chromosome entier. Les quatre chromosomes les plus métacentriques sont indiqués par un (M) ; les quatre plus acentriques par un A

avec les caractéristiques et points de repères normaux d'un génome avant de pouvoir y repérer des changements. C'est pourquoi nous commençons cette discussion par un examen de la topographie des chromosomes.

La topographie des chromosomes

Les traits le plus souvent utilisés pour caractériser des chromosomes sont les suivants :

Taille du chromosome

La taille des chromosomes peut varier considérablement au sein du même génome. Chez l'homme, par exemple, cette taille varie d'un facteur trois à quatre, depuis le chromosome 1 (le plus grand) jusqu'au chromosome 21 (le plus petit), comme nous l'avons vu dans le tableau 8-1. S'il peut être difficile chez certaines espèces d'identifier les chromosomes uniquement par leur taille, il reste qu'on peut au moins définir des groupes de chromosomes de tailles semblables. On se borne alors à répertorier une modification atteignant un membre d'un groupe donné sans préciser davantage.

Position du centromère

Le centromère est la structure à laquelle les fibres du fuseau s'attachent. La région centromérique apparaît généralement comme un resserrement du chromosome, appelé la **constriction primaire.** La position de cette constriction détermine le rapport entre les longueurs respectives des deux bras et ce rapport est une caractéristique utile (tableau 8-1). On classe les diverses localisations centromériques en **télocentriques** (à l'une des extrémités), **acrocentriques** (plus près d'une extrémité que de l'autre) ou **métacentriques** (au milieu). Outre le rapport entre bras, la position du centromère détermine la forme que le chromosome prend durant l'anaphase, depuis le bâtonnet non coudé jusqu'au V en passant par le J (figure 8-1). Chez certains organismes comme les lépidoptères, les centromères sont considérés comme «diffus» : les fibres du fuseau s'attachent tout au long du chromosome. Lorsqu'un tel chromosome se brise, les deux fragments qui en résultent peuvent encore migrer vers les pôles. Au contraire, la cassure d'un chromosome équipé d'un seul centromère produit un fragment qui en est dépourvu et par conséquent incapable de migrer vers l'un des pôles. Des fragments de chromosomes dépourvus de centromères sont dits acentriques (figure 8-2).

Nous connaissons à présent la structure moléculaire des centromères de quelques organismes. Il en va de même pour les extrémités des chromosomes, les **télomères.** Bien que dépourvus de caractéristiques morphologiques, les télomères possèdent une structure moléculaire bien particulière dont l'intégrité est requise pour que le comportement des chromosomes reste normal. Chez la levure, la connaissance de ces détails structuraux a ouvert des perspectives nouvelles : on peut à présent y construire à volonté des chromosomes nouveaux à partir d'un centromère, de deux télomères et de tout autre fragment de matériel génétique auquel l'expérimentateur s'intéresse.

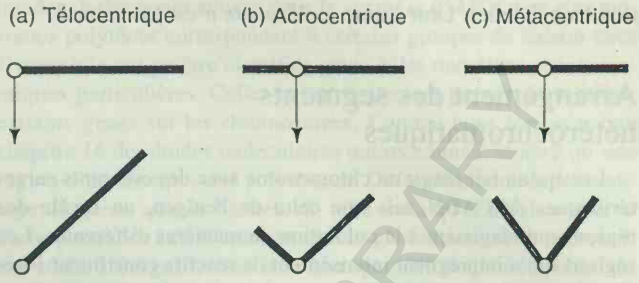


Figure 8-1. La classification des chromosomes d'après la position du centromère. Chez un chromosome télocentrique, le centromère est à l'une des extrémités ; quand le chromosome se déplace vers un pôle de la cellule pendant l'anaphase de la division cellulaire, il présente l'aspect d'un simple bâtonnet. Chez un chromosome acrocentrique, le centromère se trouve entre une extrémité du chromosome et son milieu ; au cours des mouvements de l'anaphase, le chromosome a l'aspect d'un J. Chez un chromosome métacentrique, le centromère est au milieu ; à l'anaphase, un tel chromosome a l'aspect d'un V.

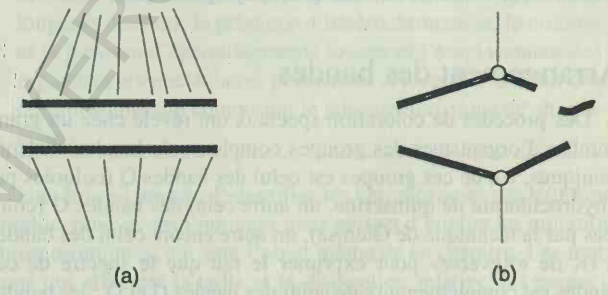


Figure 8-2. Modes d'attachement des fibres du fuseau aux chromosomes. (a) Un exemple de centromère diffus ; dans cette situation assez rare de nombreuses fibres s'attachent au chromosome tout au long de celui-ci. Une cassure chromosomique n'entraîne la perte d'aucun fragment. (b). Attachement des fibres à un seul centromère, le cas le plus fréquent. Une cassure produit un fragment acentrique, perdu pendant la division.

Position des organisateurs nucléolaires

Le nombre de nucléoles varie fortement d'un organisme à l'autre. Les nucléoles contiennent de l'ARN ribosomique, un constituant essentiel des ribosomes. Les cellules diploïdes possèdent fréquemment deux nucléoles ; on les trouve dans le voisinage immédiat de constrictions chromosomiques secondaires appelées **organisateurs nucléolaires,** qui occupent des positions bien définies. Ces organisateurs contiennent les gènes de l'ARN ribosomique. Leurs positions constituent des repères pour l'analyse cytogénétique.

Arrangement des chromomères

Visibles à certains stades de la division cellulaire les chromomères sont des granules chromosomiques de taille et de localisa-

tion bien définies. Leur nature moléculaire n'est pas connue.

Arrangement des segments hétérochromatiques

Lorsqu'on fait réagir un chromosome avec des colorants caractéristiques de l'ADN, tels que celui de Feulgen, on révèle des régions qui réagissent à la coloration de manières différentes. Les régions qui s'imprègnent intensément de réactifs constituent l'**hétérochromatine,** celles qui sont moins marquées forment l'**euchromatine**. On pense que cette différence de comportement reflète le degré de compacité de l'ADN du chromosome. L'hétérochromatine peut être **constitutive** ou **facultative**. La constitutivité désigne une caractéristique permanente d'un locus chromosomique ; en ce sens, c'est un trait héréditaire. La figure 5-15 donne des exemples caractéristiques d'hétérochromatine constitutive chez la tomate. Le type facultatif peut être présent ou absent à l'un ou l'autre locus chromosomique. Les emplacements respectifs de l'hétérochromatine et de l'euchromatine le long d'un chromosome sont de bons marqueurs cytogénétiques.

Arrangement des bandes

Des procédés de coloration spéciaux ont révélé chez un grand nombre d'organismes des groupes complexes de bandes chromosomiques. Un de ces groupes est celui des bandes Q (colorées par l'hydrochlorure de quinacrine, un autre celui des bandes G (colorées par la technique de Giemsa), un autre encore celui des bandes R (R de «Reverse» pour exprimer le fait que le spectre de ces bandes est complémentaire de celui des bandes G et Q ; les bandes R sont colorées par l'acridine orange après dénaturation thermique). La figure 8-3 (a) montre un exemple de bandes G dans les chromosomes humains.

Chez les chromosomes géants présents dans certains organes des diptères, il existe un système de bandes bien particulier, amplement utilisé par les cytogénéticiens depuis de nombreuses années. En 1881, E.G. Balbiani décrivit des structures singulières dans le noyau de certaines cellules sécrétrices chez les mouches. Ces structures étaient allongées, avaient la forme d'une saucisse et présentaient des renflements aussi bien que des stries transversales. Malheureusement Balbiani ne reconnut pas en elles des chromosomes et de ce fait sa communication passa inaperçue. Ce ne fut pas avant 1933 que Theophilus Painter, Ernst Heitz et M. Bauer les redécouvrirent et prirent conscience qu'il s'agissait de chromosomes.

Dans les tissus sécréteurs, tels que les tubules de Malpighi, le rectum, l'intestin, les coussinets plantaires, et les glandes salivaires des diptères, les chromosomes répliquent leur matériel génétique un grand nombre de fois sans se scinder en chromatides distinctes. Par conséquent, au fur et à mesure que le chromosome multiplie ses répliques, il s'allonge et s'épaissit. Ce faisceau de répliques porte le nom de **chromosome polytène**. Chez *Drosophila melanogaster,* par exemple, où le nombre haploïde est de 4, on n'aperçoit que quatre chromosomes dans les tissus de ce type parce que, pour une raison quelconque, les homologues restent étroitement appariés. En outre les quatre chromosomes sont soudés ensemble à l'endroit du **chromocentre** qui est formé par la coalescence des zones hétérochromatiques présentes autour des centromères de ces quatre paires de chromosomes. La figure 8-4 montre le chromocentre des chromosomes des glandes salivaires chez *Drosophila* ; L et R désignent les bras de chromosome considérés arbitrairement comme gauche («left») et droit («right»).

Le long d'un chromosome polytène on peut identifier des stries, appelées **bandes**, qui diffèrent par leur largeur et leur morphologie. De plus certaines régions présentent à certains moments des renflements ou nodules (les «**puffs**») voire des dilatations considérables (les **anneaux de Balbiani**) ; on présume qu'elles corres-

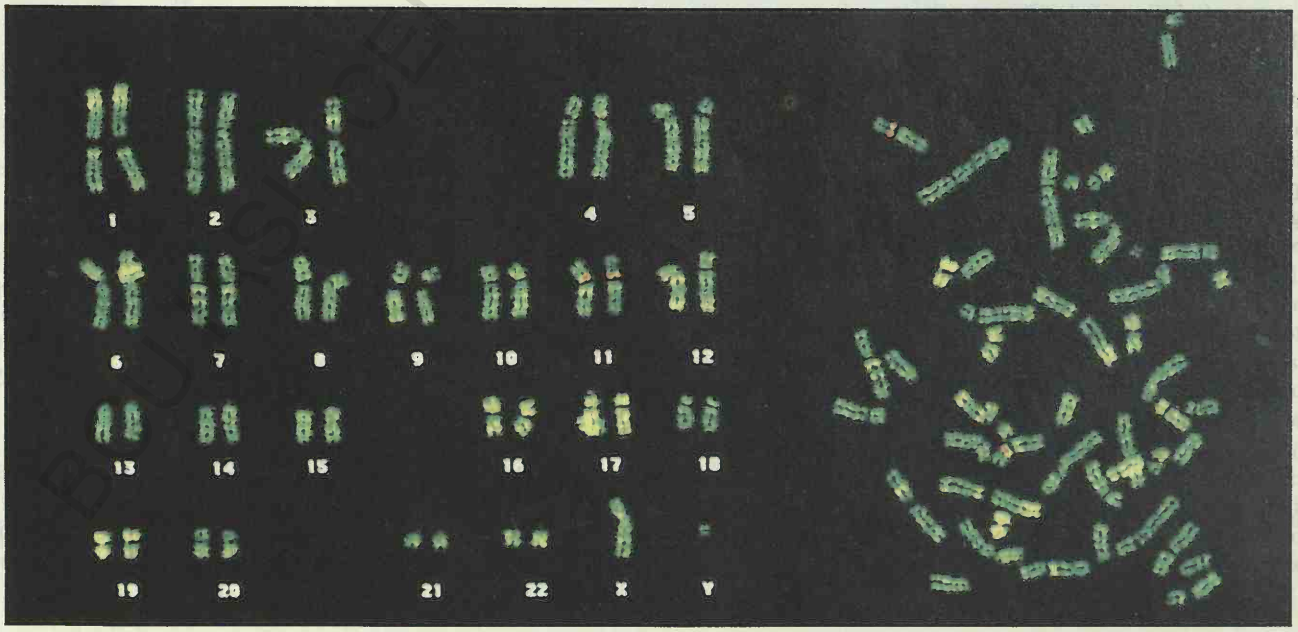
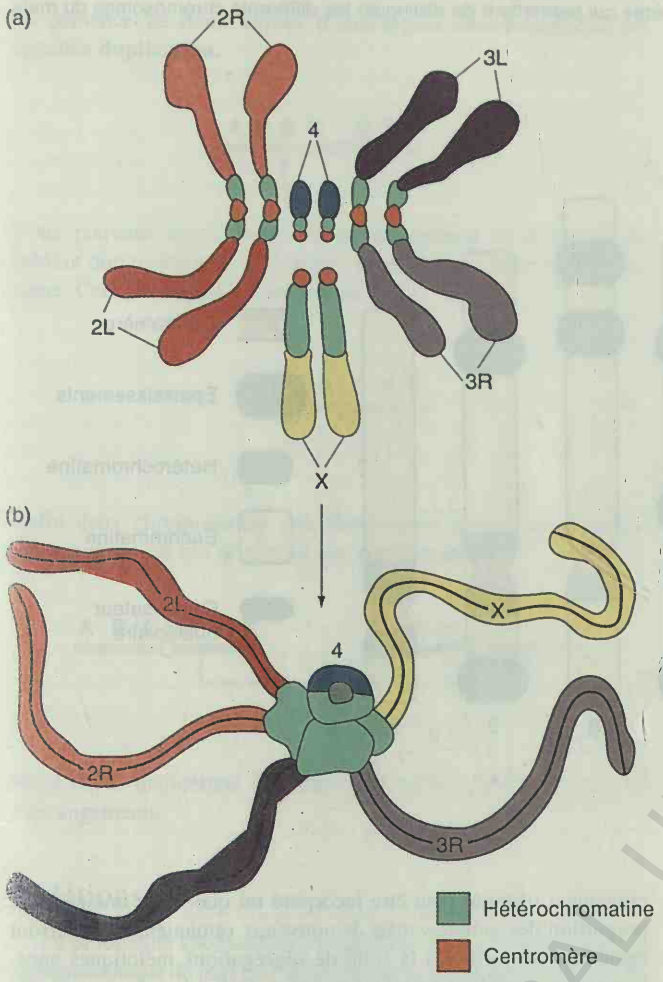


Figure 8-3. Chromosomes d'une personne de sexe masculin colorés au Giemsa pour révéler les bandes.



pondent à des zones actives dans la synthèse d'ARN. Les chromosomes polytènes correspondant à certains groupes de liaison chez *Drosophila* ont pu être identifiés grâce à des mutations chromosomiques particulières. Celles-ci ont également permis de localiser certains gènes sur les chromosomes. Comme nous le verrons au chapitre 16 des études moléculaires ont récemment montré qu'une région d'un chromosome polytène de *Drosophila* contenait davantage de gènes que de bandes, de telle sorte qu'il n'existe pas de correspondance stricte entre bandes et gènes, comme on le pensait autrefois. La signification de l'arrangement des bandes chez les mammifères n'est pas plus claire mais l'importance des bandes semble refléter leur contenu en nucléotides. La plupart des gènes actifs résident dans les bandes peu condensées.

En s'appuyant sur l'ensemble de leurs particularités structurales, les cytogénéticiens peuvent identifier les différents chromosomes de nombreuses espèces. La figure 8-5, par exemple, représente un diagramme des chromosomes du maïs. Remarquer comment les particularités individuelles des deux chromosomes font de chacun d'eux une structure unique.

Message Des caractéristiques comme la taille, le rapport des longueurs des bras, la présence d'hétérochromatine, le nombre et la position d'épaississements locaux et l'emplacement des organisateurs nucléolaires permettent d'identifier chacun des chromosomes qui composent le jeu caractéristique de chaque espèce.

Une fois en mesure d'identifier les chromosomes par leur topographie, nous avons l'outil qui nous permet d'étudier les mutations chromosomiques, qui sont l'objet même de ce chapitre. Les mutations qui affectent la taille et la disposition relative des points de repère chromosomiques — c'est-à-dire des mutations structurales ou encore **réarrangements chromosomiques** — seront traitées dans les sections suivantes. Les mutations qui affectent le nombre des chromosomes le seront au chapitre 9.

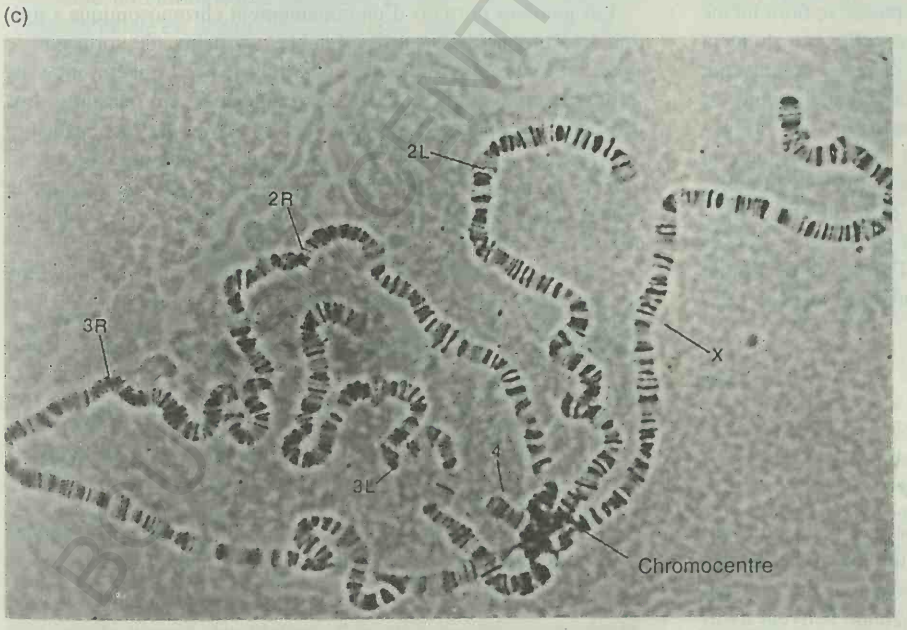
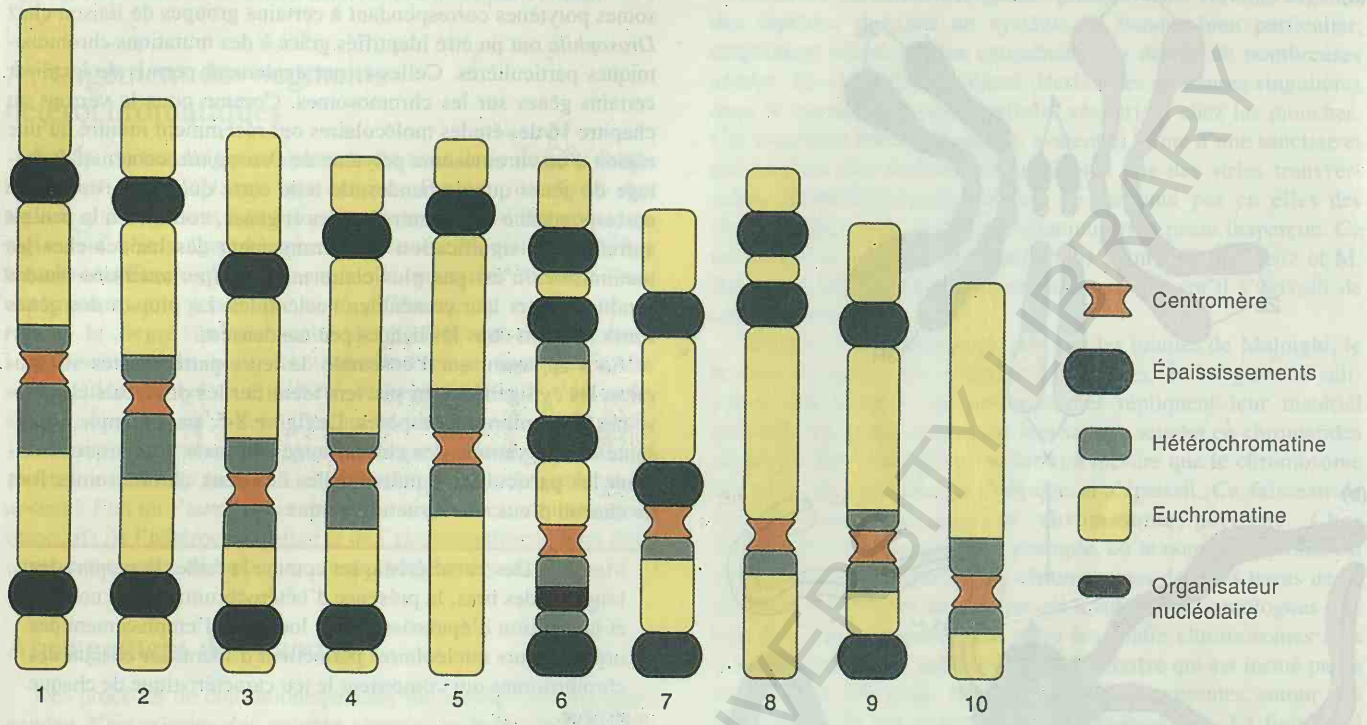


Figure 8-4. Chromosomes polytènes formant un chromocentre dans une glande salivaire de la drosophile. (a) Chromosomes mitotiques en métaphase, leurs bras représentés par des couleurs différentes. (b) L'hétérochromatine des différents chromosomes coalesce pour former le chromocentre. (c) Photographie de chromosomes polytènes. (Tom Kaufman)

Figure 8-5. Les repères qui permettent de distinguer les différents chromosomes du maïs.



Avant d'aller plus loin considérons deux aspects du comportement des chromosomes qui revêtent une grande importance si l'on veut comprendre la genèse des anomalies de structure. Le premier concerne la très grande affinité réciproque que manifestent les régions chromosomiques homologues pendant la prophase méiotique ; celle-ci explique que cet appariement puisse se faire même au prix de contorsions remarquables, comme celles qui donnent naissance aux curieuses structures observées dans des cellules qui contiennent un jeu de chromosomes normal et un jeu aberrant. De pareilles contorsions s'observent entre homologues de chromosomes polytènes. Deuxième aspect important : pour se former, un changement de la structure chromosomique requiert habituellement une ou des cassures préalables et les extrémités des fragments chromosomiques ainsi libérés sont très «réactives», c'est-à-dire qu'elles tendent à souder les fragments l'un à l'autre. Il n'en est cependant pas ainsi des télomères (les extrémités normales des chromosomes).

Types de réarrangements structuraux dans les chromosomes

Un réarrangement chromosomique peut survenir dans toute cellule de n'importe quel tissu ; il en résultera un karyotype hétérozygote comprenant un jeu normal et un jeu remanié. Les réarrangements qui se produisent dans un tissu somatique peuvent avoir des conséquences sur le phénotype d'une cellule ou d'un secteur cellulaire somatique. Ceux qui surviennent dans un tissu germinal peuvent générer des méiocytes hétérozygotes. Dans ce cas le réarrangement original peut être incorporé tel quel dans une certaine proportion des gamètes mais de nouveaux remaniements pourront également se former à la suite de ségrégations méiotiques anormales et se retrouver parmi les gamètes. Enfin des réarrangements peuvent survenir dans les gamètes eux-mêmes.

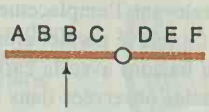
Les gamètes porteurs d'un remaniement chromosomique s'uniront très probablement à des gamètes normaux, de sorte que le zygote et toutes les cellules des individus de la F1 qui en sont issus seront hétérozygotes pour le réarrangement en question. Les conséquences phénotypes potentielles en seront dès lors beaucoup plus sévères que pour des réarrangements somatiques. En outre, *tous* les méiocytes de tels individus seront hétérozygotes pour le réarrangement et une forte proportion de leurs gamètes contiendront le réarrangement original ou un dérivé.

Dans ce qui suit nous nous intéresserons surtout aux individus dont le corps entier est hétérozygote pour un réarrangement ; ce dernier peut s'être produit dans les gonades ou gamètes parentaux ou peut dériver d'un parent dont toutes les cellules étaient également hétérozygotes.

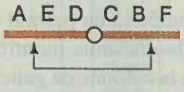
Pour faciliter la discussion nous utiliserons des lettres pour représenter différentes régions du chromosome. Ces lettres désignent donc des segments d'ADN assez longs, pouvant comporter de nombreux gènes.

La simple perte d'un segment chromosomique est appelée **délétion** ou **déficience.** Dans le schéma ci-dessous, c'est la région B qui a été délétée.

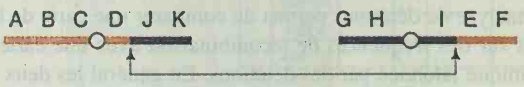
La présence de deux copies d'une région chromosomique est appellée **duplication.**



Nous pouvons aussi concevoir qu'un segment de chromosome subisse une rotation de 180 degrés et se réinsère dans le chromosome. Ceci provoque une **inversion** :



Enfin deux chromosomes non homologues pourraient échanger des segments, ce qui donnerait une **translocation** :



Nous allons maintenant examiner un à un ces différents types de réarrangements.

Délétions

La production spontanée d'une délétion nécessite deux cassures chromosomique de part et d'autre du segment qui sera perdu. Si les deux extrémités se rejoignent et que l'une porte un centromère il en résulte un chromosome raccourci, porteur d'une délétion. Le fragment délété est acentrique ; il est donc immobile et sera perdu. Les radiations ionisantes sont un mutagène efficace qui induit toutes sortes de réarrangements chromosomiques. Ce type de radiations, dont les rayons X et γ sont des exemples, est très énergétique et provoque des cassures dans les chromosomes. La manière dont les bouts libres se rejoignent détermine le type de réarrangement produit. Deux types de délétion peuvent se produire : une cassure simple peut provoquer une **délétion terminale** et deux cassures une **délétion interstitielle** (figure 8-6).

L'effet d'une délétion dépend de sa taille. Une petite délétion localisée dans un gène (**délétion intragénique**) inactive celui-ci et a le même effet qu'un allèle nul. Si le phénotype nul homozygote est viable (comme dans l'albinisme humain) la délétion homozygote le sera aussi. Les délétions intragéniques peuvent se distinguer de simples substitutions par le fait qu'elles ne réversent pas.

Dans la plus grande partie de cette section nous traiterons de **délétions multigéniques**, qui éliminent de deux à plusieurs milliers de gènes. Celles-ci ont naturellement des conséquences plus sévères. Si, par croisement, l'une de ces délétions est rendue homozygote, la combinaison sera presque toujours létale.Ceci suggère que la plupart des régions d'un chromosome soient essentielles à la survie et que l'élimination d'un quelconque fragment du génome entraîne des conséquences graves. Même des individus hétérozygotes pour une délétion — c'est-à-dire porteurs d'un

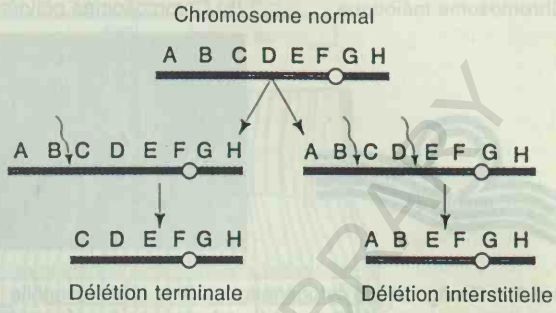


Figure 8-6. Formation de délétions terminales et interstitielles. Les chromosomes peuvent se rompre sous l'effet des radiations ionisantes (flèches ondulées). Une délétion terminale résulte d'une rupture près de l'extrémité d'un chromosome alors qu'il faut deux ruptures pour produire une délétion interstitielle. Le fragment acentrique (CD) est perdu tandis que la portion terminale (AB) se ressoude au reste du chromosome.

homologue normal et d'un homologue déficient — peuvent ne pas être viables ; en effet le génome peut avoir subi au cours de l'évolution des ajustements fins conduisant à un équilibre requis pour assurer une viabilité normale ; une délétion perturbera évidemment cet équilibre. Nous rencontrerons souvent cette notion d'équilibre au cours de ce chapitre et du suivant parce que plusieurs types de mutations chromosomiques perturbent le rapport des gènes présents dans le génome. Si ces récessifs sont «couverts» par des allèles sauvages sur l'autre homologue, ils ne s'expriment pas. Une délétion peut cependant «découvrir» des récessifs, les permettant de s'exprimer au niveau phénotypique.

Message La létalité des délétions hétérozygotes s'explique par un déséquilibre du génome et par le démasquage d'allèles récessifs létaux.

Néanmoins de courtes délétions peuvent s'avérer viables en présence d'un homologue normal. Lorsqu'on examine les chromosomes de tels hétérozygotes à la méiose, on peut détecter la région délétée par le défaut d'appariement qui se manifeste à son niveau sous l'aspect d'une boucle formée par l'homologue normal : «**boucle de délétion**» (figure 8-7a). De telles boucles s'observent également chez les chromosomes polytènes des insectes, où les homologues restent accolés en permanence (figure 8-7b). Il est donc possible de localiser des délétions sur un chromosome par cette technique.

Certaines délétions déterminent des phénotypes caractéristiques. Citons par exemple la délétion qui, à l'état hétérozygote chez *Drosophila*, produit le phénotype dit «notch-wing» (à ailes entaillées) ; dans cette configuration la mutation apparaît donc comme dominante. Cependant, comme c'est une délétion, elle est létale à l'état homozygote ; elle est donc récessive en ce qui concerne son effet létal.

Mais qu'en est-il des propriétés génétiques des délétions en général ? Lorsque nous ne sommes pas en mesure de faire des observations cytogénétiques — comme repérer des boucles de

(a) Chromosome méiotique (b) Chromosomes polytènes

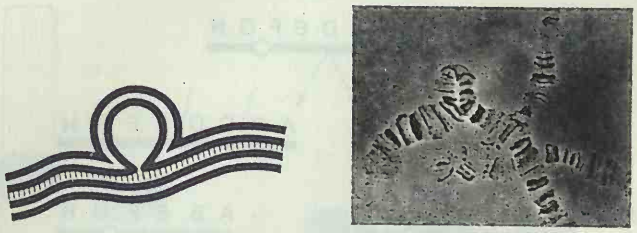
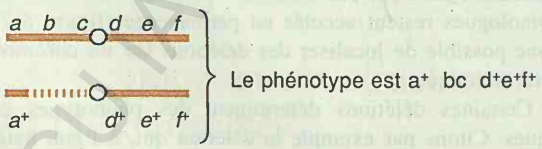


Figure 8-7. Configurations cytogénétiques chez une drosophile hétérozygote pour une délétion. (a) Il se forme une boucle latérale dans le chromosome méiotique. Les gènes inclus dans cette boucle n'ont pas de vis-à-vis avec lequel s'apparier lors de la synapsis. (b) Comme les chromosomes polytènes de *Drosophila* ont des profils de bandes caractéristiques, les bandes manquant dans le chromosome déficient peuvent être identifiées dans la boucle de délétion formée par le chromosome normal.

délétion dans les chromosomes des glandes salivaires de *Drosophila* — pouvons nous déceler ce type de mutation ? Certes, car on peut alors s'en remettre à des critères génétiques. L'un de ces critères est la non-viabilité à l'état homozygote mais ce serait aussi le fait de n'importe quel gène létal. Un autre critère est la suppression du crossing-over dans la région altérée par la délétion ; cependant une telle suppression peut résulter d'autres aberrations et des délétions très localisées peuvent n'avoir que peu d'effet sur la fréquence de crossing-over. C'est en fait l'incapacité de revenir à la condition normale (soit de «réverser» en jargon génétique moderne) qui constitue le meilleur indice d'une délétion. Un autre bon critère est l'expression phénotypique d'un allèle récessif présent sur un chromosome normal à l'endroit même où son homologue est affecté par une délétion. Considérons par exemple la délétion de deux des six loci ci-dessous :

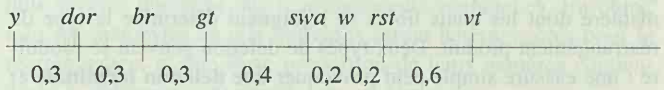


Cet effet de démasquage est à mettre en rapport avec le caractère généralement non viable des délétions. On sait que beaucoup d'organismes diploïdes portent des mutations nuisibles, voire létales, masquées par leurs allèles normaux dominants. Des délétions pourraient conduire à l'expression de ces allèles récessifs si elles supprimaient les régions contenant les allèles normaux. Une telle **pseudodominance** (ou expression d'un gène récessif présent à un seul exemplaire) permet aussi de localiser physiquement le gène en question en relevant l'emplacement des délétions qui peuvent la provoquer. Ce relevé permet alors de corréler la carte génétique (basée sur la liaison) avec la carte cytologique (basée sur la position des boucles observées dans certains cas de pseudodominance). Si l'on considère l'ensemble des analyses de ce type on peut conclure que les deux types de cartes correspondent en général assez bien — agréable confirmation cytologique de ce qui était au départ une création purement génétique. Un exemple tiré de la drosophile est représenté sur la figure 8-8. Dans ce diagramme, la carte de recombinaison est tracée au-dessus ; les unités de distance sont comptées en partant de la gauche. Les barres horizontales sous le chromosome montrent l'extension des délétions répertoriées dans la colonne de gauche. La mutation «prune» (*pn*) ne se montre pseudodominante que si elle est combinée à la délétion 264-38 ; elle se trouve donc dans la région qui s'étend de 2D-4 à 3A-2. Par contre, *fa* se montre pseudodominante avec toutes les délétions sauf deux, ce qui permet de la localiser dans la bande 3C-7.

L'analyse de délétions permet de comparer une carte de liaison basées sur des fréquences de recombinaison avec une carte chromosomique jalonnée par des délétions. En général les deux cartes correspondent bien, ce qui apporte la confirmation cytologique de déductions purement génétiques.

Message Les cartes chromosomiques basées sur l'analyse de délétions s'accordent bien avec les cartes de liaison établies par recombinaison.

En outre, un effet de pseudodominance peut servir à localiser une petite délétion qui ne peut être visualisée au microscope. Considérons un chromosome X de drosophile qui porte une mutation récessive létale soupçonnée d'être une délétion ; désignons ce chromosome par le sigle «X*». Nous pouvons accoupler des femelles porteuses de X* avec des mâles portant différents allèles récessifs dont on sait qu'ils se trouvent sur le même chromosome. Par exemple, la carte de l'extrémité proximale du chromosome est



Supposez que nous obtenions uniquement des mouches de type sauvage dans les croisements entre femelles X* / X et des mâles porteur de *y, dor, br, gt, rst* ou *vt,* mais que nous observions la pseudodominance de *swa* et *w* avec X* (c'est-à-dire que X* / *swa* montre le phénotype récessif *swa* et X* / *w* le phénotype récessif *w*). Dans ce cas nous disposons d'un bon indice génétique que X* a subi une délétion qui inclut au moins les loci *swa* et *w* mais pas *gt* ni *rst*.

Message Les délétions se reconnaissent à l'analyse génétique par (1) leur incapacité à réverser, (2) la pseudodominance et (3) leur létalité récessive ; elle se reconnaissent cytologiquement par (4) la formation de boucles.

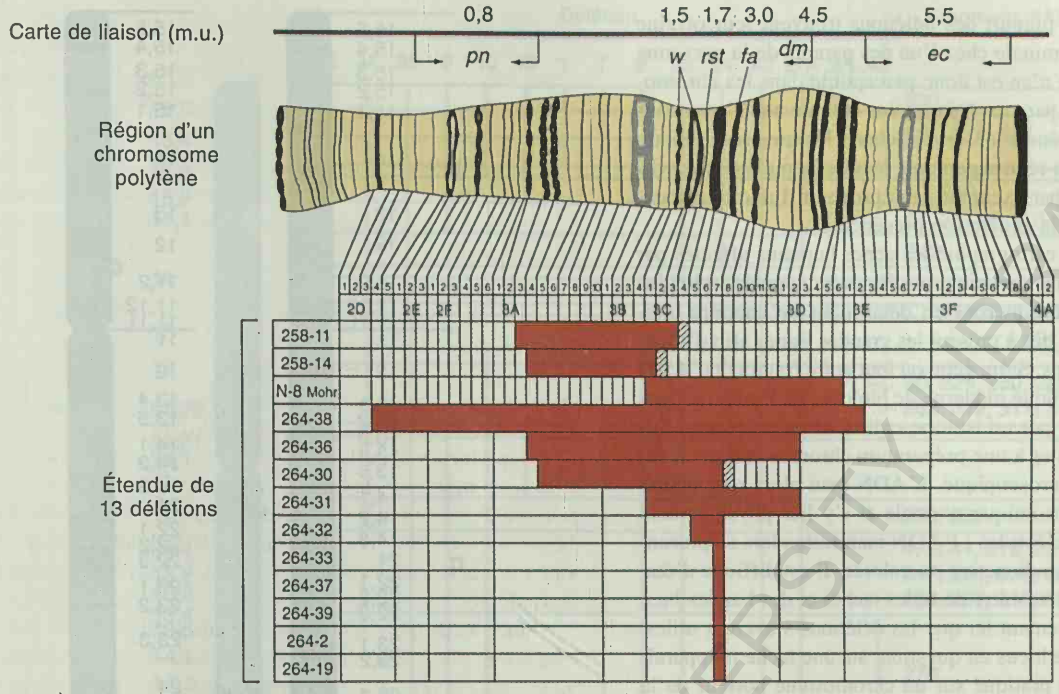


Figure 8-8. Localisation de gènes de *Drosophila* par tests de pseudo-dominance dans des hétérozygotes contenant une délétion et un chromosome normal. Les traits rouges indiquent la longueur des segments délétés dans 13 mutants différents. Tous les allèles récessifs couverts par une délétion donnée seront exprimés.

Les cliniciens trouvent régulièrement des délétions dans les chromosomes humains. Dans la plupart des cas, elles sont relativement courtes mais elles exercent néanmoins une influence phénotypique néfaste lorsqu'elles se trouvent en condition hétérozygote. Ceci est quelque peu surprenant : comment la délétion d'une ou de deux bandes chromosomiques seulement peut-elle produire des anomalies sévères alors que l'autre homologue semble comporter tout le matériel génétique normal nécessaire à un développement harmonieux ? Il est vraisemblable que l'équilibre entre les différentes régions est crucial et que même des perturbations mineures de ce dernier peuvent affecter le développement.

La délétion de certains segments chromosomiques produit des syndromes bien précis. Un exemple en est le «cri du chat», causé par une délétion affectant l'extrémité du bras le plus court du chromosome 5 (figure 8-9). On est convenu de désigner le bras le plus court par la lettre p et le plus long par la lettre q. Les bandes délétées dans le syndrome du cri du chat sont 5 p15-2 et 5 p15-3, les deux plus distales que l'on puisse identifier sur 5 p. Le phénotype le plus caractéristique du syndrome est celui qui lui donne son nom, les cris semblables à des miaulements que poussent les jeunes enfants affectés par cette délétion. D'autres manifestations phénotypiques en sont la microencéphalie (une tête anormalement petite) et un visage lunaire. Tout comme les syndromes causés par d'autres délétions, celui du cri du chat se manifeste par un retard mental.

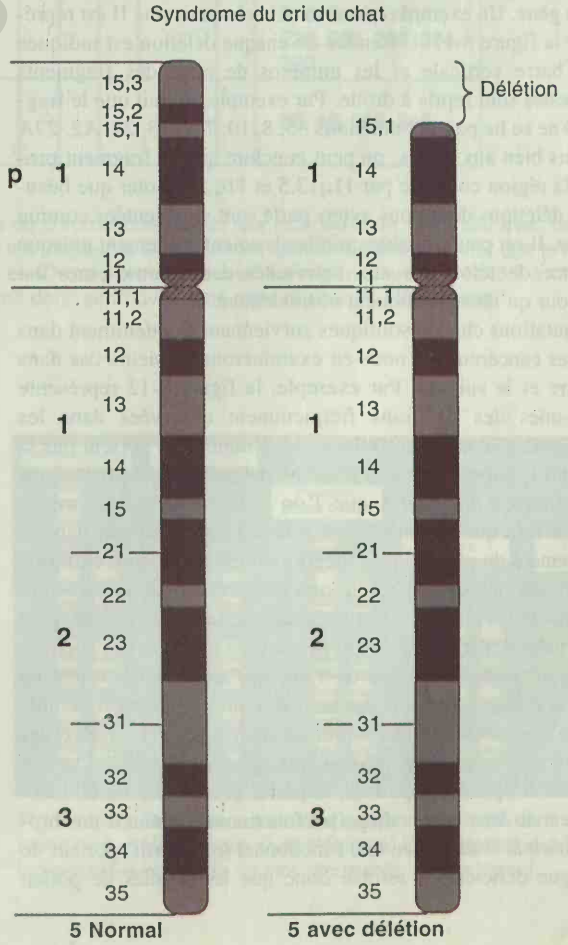


Figure 8-9. La cause du syndrome «cri du chat» chez l'Homme est la perte de l'extrémité du bras court de l'un des homologues du chromosome 5.

Chez l'Homme, la plupart des délétions trouvent leur origine dans une mutation germinale chez l'un des parents de la personne atteinte et aucun signe n'en est donc perceptible dans les chromosomes somatiques des parents. Néanmoins comme nous le verrons plus loin, quelques délétions observées chez l'Homme résultent du comportement d'autres réarrangements lors de la méiose. Le syndrome du cri du chat, par exemple, peut provenir d'une translocation s'étant produite à la génération précédente.

Les généticiens ont cartographié les gènes humains affectés par des délétions grâce à une technique moléculaire appelée **hybridation in situ.** Nous l'expliquerons en détail dans un chapitre ultérieur mais retraçons-en dès à présent les grandes lignes afin d'illustrer l'utilité des délétions. Si un gène ou tout autre fragment d'ADN a été isolé par une technique moderne de biologie moléculaire, il est possible de le marquer par un isotope radioactif ou un réactif chimique et puis de l'ajouter à une préparation chromosomique destinée à l'observation microscopique. L'ADN peut alors reconnaître sa contrepartie chromosomique normale et s'y lier physiquement par appariement de nucléotides ; l'ADN manifeste alors sa présence par une petite tache radioactive ou colorée. Il est difficile d'établir une corrélation stricte entre de telles taches et des bandes bien précises et c'est précisément ici que les délétions s'avèrent utiles. Si la délétion couvre le locus en question, aucune tache n'apparaîtra lorsque le test sera pratiqué sur un chromosome porteur de la délétion, puisque la région nécessaire à la liaison est absente (figure 8-10). En établissant des lignées à partir de cellules prélevées sur des patients porteurs de délétions, les généticiens développent des séries de délétions qui se recouvrent partiellement sur toute la longueur d'une région et ces séries sont utilisées pour préciser la position d'un gène. Un exemple concernant le chromosome II est représenté sur la figure 8-11. L'étendue de chaque délétion est indiquée par une barre verticale et les numéros de code des fragments d'ADN testés sont repris à droite. Par exemple, du fait que le fragment 270 ne se lie pas aux délétions 35, 8, 10, 7, 9, 23, 24, A2, 27A et 4D mais bien aux autres, on peut conclure que ce fragment provient de la région couverte par 11q13.5 et 11q.21. Noter que beaucoup des délétions dont nous avons parlé sont représentées comme terminales. Il est peu probable qu'elles le soient réellement puisque la présence de télomères aux extrémités des chromosomes est requise pour qu'ils se répliquent normalement.

Des mutations chromosomiques surviennent fréquemment dans les cellules cancéreuses ; nous en examinerons plusieurs cas dans ce chapitre et le suivant. Par exemple, la figure 8-12 représente quelques-unes des délétions fréquemment observées dans les tumeurs solides. Toutes les cellules de la tumeur ne portent pas la délétion en question et c'est souvent un mélange de mutations chromosomiques différentes que l'on retrouve dans une même tumeur. Le rôle que ces mutations jouent éventuellement dans le développement du phénotype cancéreux n'est pas encore compris.

L'étude des délétions a révélé une différence intéressante entre les animaux et les plantes. Chez les animaux, un mâle hétérozygote pour une paire d'allèles délétion/type sauvage produira des spermatozoïdes fonctionnels porteurs de l'un ou l'autre chromosome en nombres approximativement égaux. En d'autres termes il semble que, dans une certaine mesure tout au moins, les spermatozoïdes puissent fonctionner quelle que soit leur constitution génétique. Par contre, chez les plantes diploïdes, le pollen produit par un tel hétérozygote est de deux types : du pollen fonctionnel porteur d'un chromosome normal et du pollen non fonctionnel (ou abortif) porteur de l'homologue déficient. Il semble donc que les cellules de pollen

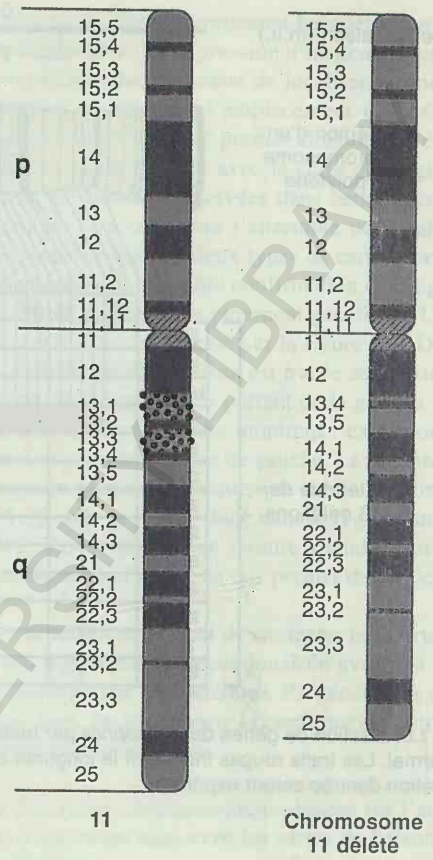


Figure 8-10. La radioactivité se localise uniquement sur l'un des deux chromosomes 11 puisque l'autre porte une délétion dans la région correspondant à la sonde d'ADN radioactif.

soient sensibles à des changements qui affectent la *quantité* de matériel génétique et cette sensibilité pourrait contribuer à éliminer les délétions de la population. La situation est différente chez les plantes polyploïdes, dont le pollen tolère beaucoup mieux les délétions. Cette tolérance est due à l'existence, même chez le pollen, de plusieurs jeux de chromosomes, de telle sorte que la perte d'un segment au sein d'un de ces jeux est moins cruciale qu'elle ne le serait dans une cellule de pollen haploïde. Quant aux ovules, que ce soit chez les plantes diploïdes ou polyploïdes, ils tolèrent assez facilement les délétions sans doute grâce à l'apport nutritif des tissus maternels qui les entourent.

Duplications

Les mécanismes de mutations chromosomiques engendrent parfois une copie surnuméraire d'un segment du chromosome. Si l'on considère un organisme haploïde qui ne possède qu'un seul jeu de chromosomes, on saisit pourquoi cet accident est appelé une

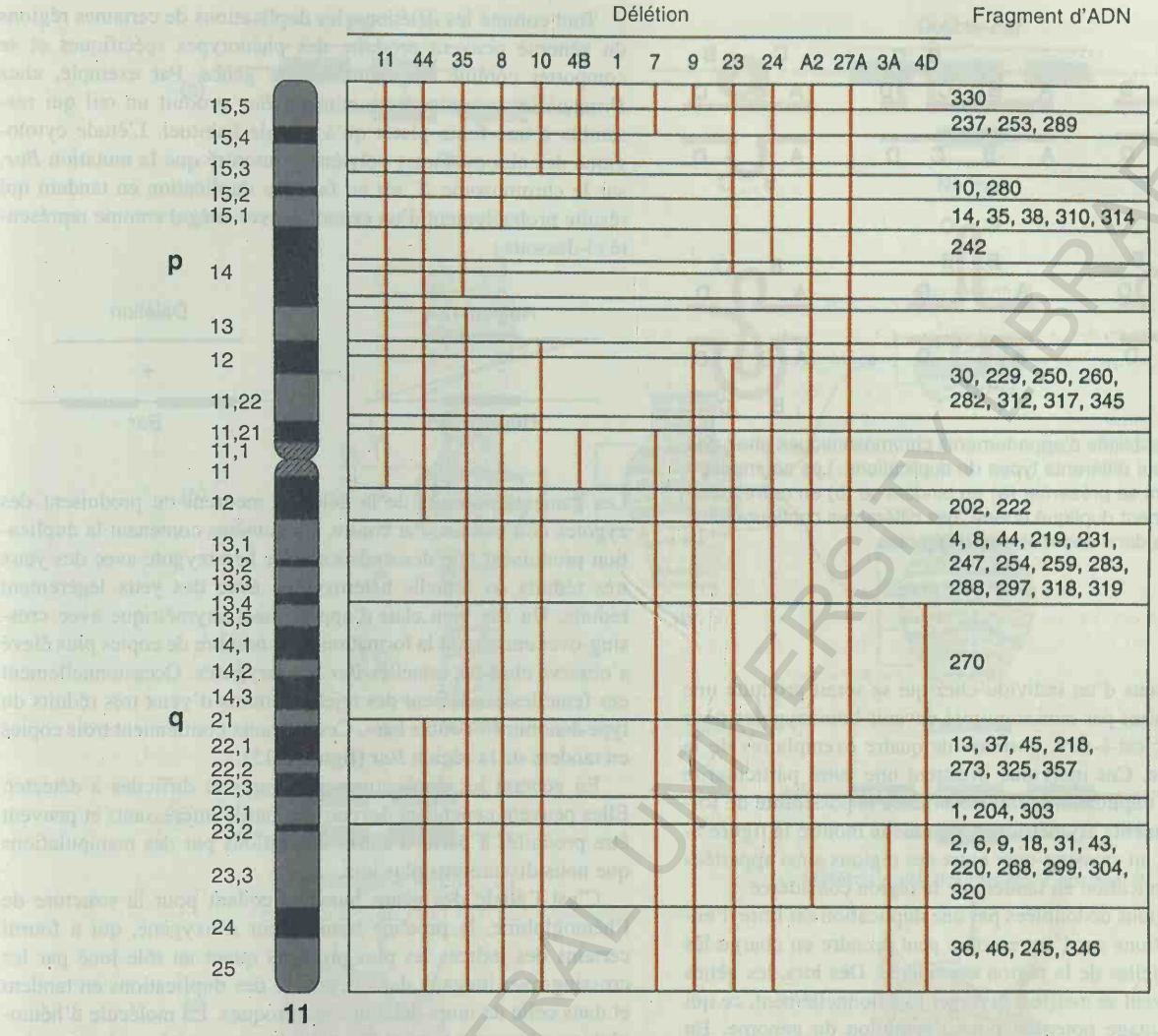


Figure 8-11. Fragments d'ADN humains localisés dans différentes régions du chromosome 11 par leur incapacité de s'hybrider avec des délétions particulières. Les traits rouges indiquent la longueur des délétions et les fragments localisés sont identifiés à droite. Noter que le fragment 270, par exemple, ne se lie pas aux délétions 35, 8, 10, 7,9,23,24,A2,27A et 4D mais bien aux autres. La région allant de 11q13.5 à 11q21 est absente de toutes les délétions ne liant pas le fragment 270 ; ce dernier doit donc se trouver dans cette région. (Y. Nakamura).

duplication, en l'occurrence celle du segment qui est maintenant en deux exemplaires. Les régions dupliquées peuvent être adjacentes ou localisées l'une au site original et l'autre ailleurs, sur le même chromosome, voire sur un autre. Chez un organisme diploïde, le jeu de chromosomes porteur de la duplication est généralement associé à un jeu normal. Les cellules d'un tel organisme auront donc trois copies de la région considérée.

Les hétérozygotes porteurs d'une duplication forment des structures d'appariement intéressantes lors de la méiose ou dans les glandes salivaires. La structure formée dépend du type de duplication. Pour l'instant, nous nous bornerons à discuter les duplications adjacentes. Celles-ci peuvent être disposées en **tandem** (par exemple ABCBCD) ou en ordre inverse (par exemple ABCCBD). Les structures d'appariement dans les hétérozygotes correspondants sont représentées sur la figure 8-13.

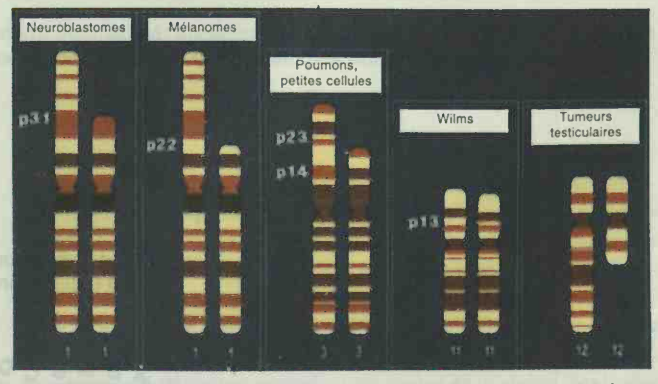


Figure 8-12. Délétions retrouvées systématiquement dans certains types de tumeurs solides chez l'Homme. Les numéros des bandes indiquent les points de rupture récurrents. (Jorge Yunis).

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

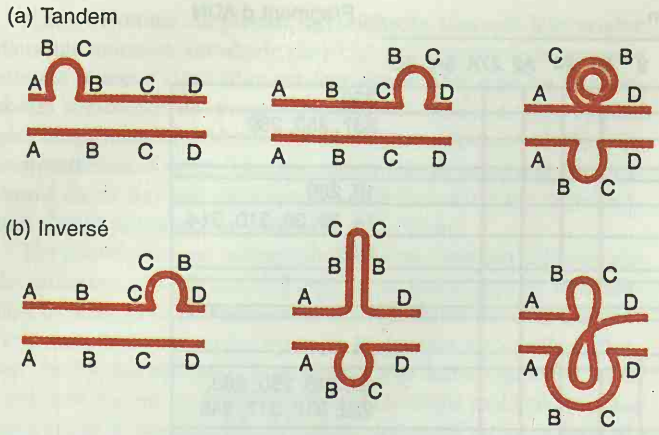


Figure 8-13. Possibilités d'appariements chromosomiques chez des hétérozygotes pour différents types de duplications. Les segments dupliqués peuvent se présenter (a) en tandem ou (b) en ordre inverse. Pour un segment dupliqué donné, ces différentes configurations, seront observées dans des méioses différentes.

Des descendants d'un individu chez qui se serait produite une duplication peuvent par consanguinité devenir homozygotes pour la duplication, c'est-à-dire, porteurs de quatre exemplaires de la région dupliquée. Ces individus illustrent une autre particularité intéressante des duplications, en l'occurrence la possibilité de former des appariements asymétriques, comme le montre la figure 8-14. A la méiose, un crossing-over entre des régions ainsi appariées produira une triplication en tandem de la région considérée.

L'une des régions dédoublées par une duplication est libre d'encourir des mutations car l'autre copie peut prendre en charge les fonctions essentielles de la région considérée. Dès lors, les gènes en question peuvent se mettre à diverger fonctionnellement, ce qui présente un avantage potentiel pour l'évolution du génome. En effet, dans bien des cas où l'on a pu comparer différents produits de gènes assumant des fonctions voisines tels que les globines (que nous discuterons plus loin), il existe de sérieux indices qu'ils trouvent leur origine dans une duplication.

Message Les duplications fournissent un excédent de matériel génétique capable d'évoluer vers de nouvelles fonctions.

Tout comme les délétions, les duplications de certaines régions du génome peuvent produire des phénotypes spécifiques et se comporter comme des mutations de gènes. Par exemple, chez *Drosophila,* la mutation dominante *Bar* produit un œil qui ressemble à une fente plutôt qu'à l'ovale habituel. L'étude cytologique des chromosomes polytènes a montré que la mutation *Bar*, sur le chromosome X, est en fait une duplication en tandem qui résulte probablement d'un **crossing-over inégal** comme représenté ci-dessous :

Les gamètes porteurs de la délétion meurent ou produisent des zygotes non viables. Par contre, les gamètes contenant la duplication produisent une descendance mâle hémizygote avec des yeux très réduits ou femelle hétérozygote avec des yeux légèrement réduits. Un cas bien clair d'appariement asymétrique avec crossing-over entraînant la formation d'un nombre de copies plus élevé s'observe chez les femelles *Bar* homozygotes. Occasionnellement ces femelles produisent des rejetons munis d'yeux très réduits du type dénommé «double bar». Ces animaux contiennent trois copies en tandem de la région *Bar* (figure 8-15).

En général les duplications sont rares et difficiles à détecter. Elles peuvent cependant devenir des outils intéressants et peuvent être produites à partir d'autres aberrations par des manipulations que nous discuterons plus loin.

C'est l'étude des gènes humains codant pour la structure de l'hémoglobine, la protéine transporteur d'oxygène, qui a fourni certains des indices les plus probants quant au rôle joué par les crossing-over inégaux dans la genèse des duplications en tandem et dans celle de leurs délétions réciproques. La molécule d'hémoglobine se compose de deux sortes de sous-unités, présentes chacune en deux exemplaires, ce qui nous fait quatre sous-unités au total. Les types de sous-unités qui constituent l'hémoglobine diffèrent suivant les stades du développement. Par exemple, le fœtus possède deux sous-unités α et deux γ ($\alpha_2\gamma_2$), alors que l'adulte a deux α et deux β ($\alpha_2\beta_2$). Les structures de ces sous-unités sont déterminées par différents gènes, dont certains sont liés et d'autres non. La figure 8-16 résume la situation.

C'est le groupe de liaison γ- δ -β qui va nous fournir les don-

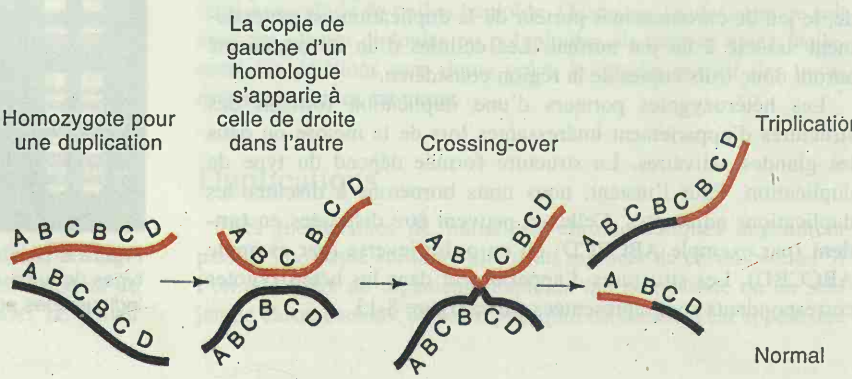


Figure 8-14. Formation de copies multiples par appariement asymétrique suivi de recombinaison chez un homozygote pour une duplication.

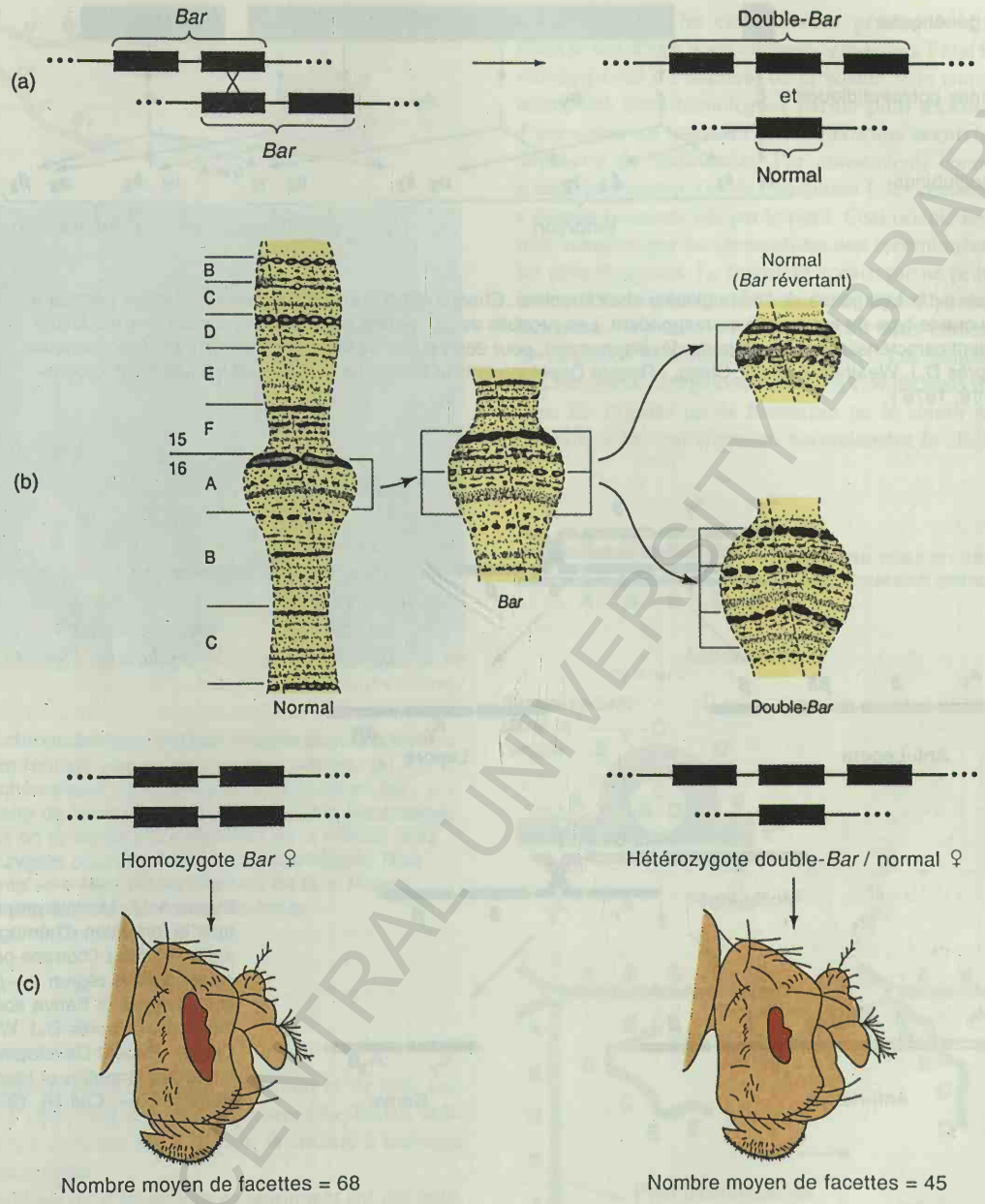


Figure 8-15. Formation de chromosomes double-*Bar* (triplication) et révertant (normal) par appariement asymétrique et recombinaison chez un homozygote pour la duplication. (a) Schéma. (b) Configuration cytologique. (c) Comparaison des phénotypes Bar et double-Bar. (Partie b d'après Bridges, *Science* 83, 1936, 210.)

nées concernant le rôle joué par les crossing-over inégaux. On a pu montrer que certaines thalassémies (un type d'affection sanguine héréditaire) impliquent des sous-unités de l'hémoglobine qui sont pour une part δ et pour une autre β (hémoglobine «Lepore») ou en partie γ, et en partie β (hémoglobine «Kénya»). L'origine de ces formes rares d'hémoglobine peut s'expliquer par les schémas de crossing-over inégaux repris dans la figure 8-17. Ce sont les types Lepore et Kénya (résultant chacun d'une délétion) qui produisent des symptômes de maladie. La figure représente également les produits de crossing-over réciproques appelés anti-Lepore et anti-Kénya.

Les duplications en tandem sont cependant rares chez l'Homme. La plupart consistent en un bras de chromosome surnuméraire (ou un segment de bras) généralement joint à un chromosome non homologue. Dans nos discussions relatives à d'autres remaniements chromosomiques - les inversions et les translocations - nous verrons ce que l'on sait sur l'origine des duplications. Tout comme les délétions, les duplications de certains gènes humains provoquent des phénotypes anormaux. Une personne porteuse d'une duplication possède trois copies de la région dupliquée alors que le reste du génome est constitué de régions présentes en deux exemplaires. On ne connaît pas d'être humain qui soit homozygote pour une duplication. Contrairement aux délétions, les duplications ne démasquent pas d'allèles récessifs nuisibles, de

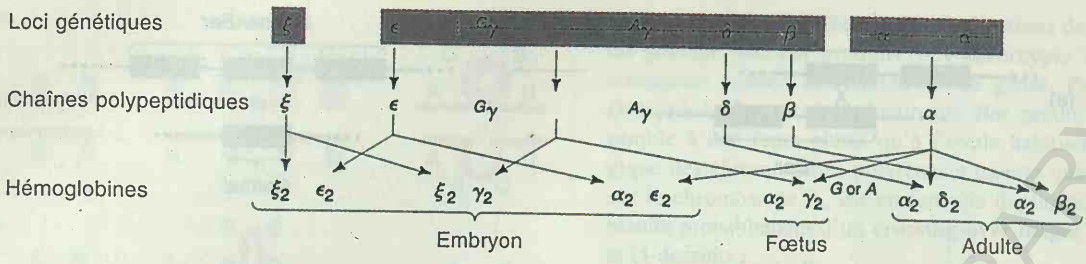


Figure 8-16. Les gènes de l'hémoglobine chez l'homme. Chaque lettre grecque représente un locus génétique ainsi que le type de sous-unité correspondant. Les produits de ces gènes se combinent suivant des modalités qui sont caractéristiques du stade de développement, pour donner des molécules d'hémoglobine fonctionnelles. (D'après D.J. Weatherall et J.B. Clegg, «Recent Developments in Molecular Genetics of Human Hemoglobin», *Cell* 16, 1979.)

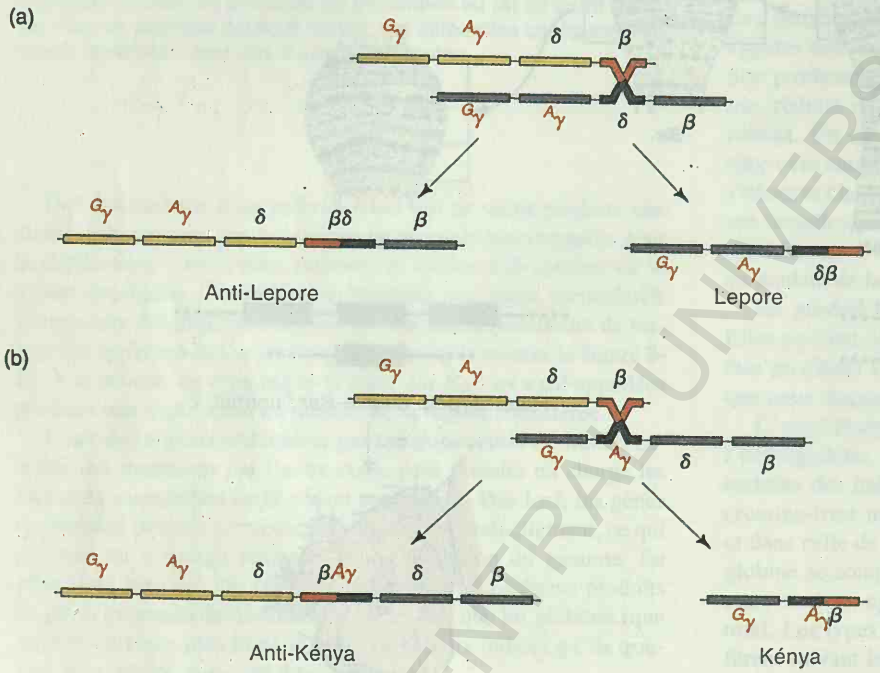


Figure 8-17. Modèle proposé pour expliquer la formation d'hémoglobines mutantes chez l'homme par crossing-over inégal dans la région γ—β. Noter que les types Lepore et Kénya sont tous deux des délétions. (D'après D.J. Weatherall et J.B. Clegg, «Recent Developments in Molecular Genetics of Human Hemoglobin», *Cell* 16, 1979.)

sorte que les anomalies qui leurs sont associées peuvent être attribuées au déséquilibre provoqué par la présence d'une copie supplémentaire.

Les technologies modernes applicables à l'ADN permettent de créer des duplications. On peut induire des cellules à absorber des fragments d'ADN originaires de la même espèce et ces fragments peuvent s'intégrer linéairement dans un chromosome. Ceci peut se produire au site normal, par remplacement de la séquence résidente, ou à un site tout-à-fait différent, appelé alors **ectopique**. Une insertion d'ADN en un site ectopique crée une duplication du fragment absorbé. Il y a donc là une manière directe et commode de produire des duplications de petite taille.

Inversions

Lorsque deux cassures se produisent dans le même chromosome, il arrive que la région intermédiaire encoure une rotation de 180 degrés avant de se ressouder aux fragments terminaux. Ce type de mutation chromosomique est appelé **inversion**. Contrairement aux délétions et aux duplications, les inversions ne modifient pas la quantité totale de matériel génétique, de sorte que les inversions sont généralement viables et ne déterminent pas d'anomalies phénotypiques. Dans certains cas, l'une des cassures se produit au sein même d'un gène essentiel et elle se manifeste alors comme une mutation génique létale liée à l'inversion. Dans ce cas, il n'est pas possible de rendre l'inversion homozygote.

BOUASSI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

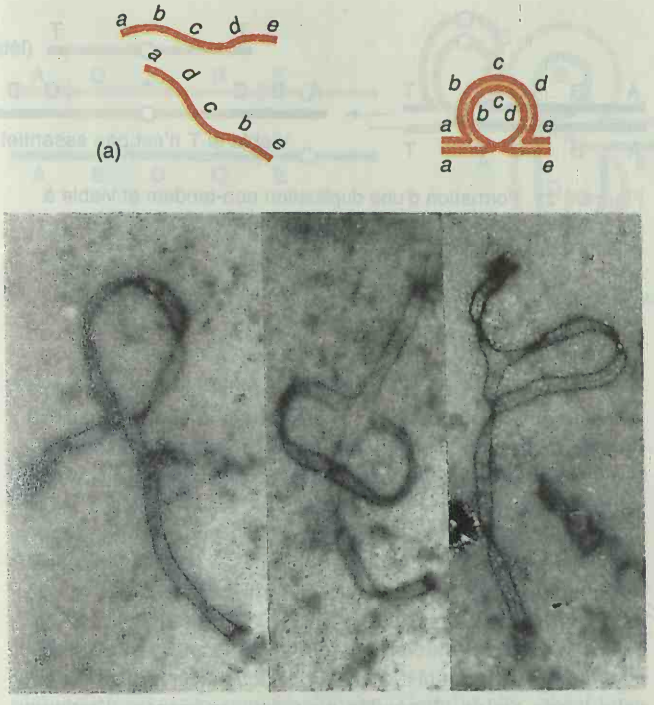
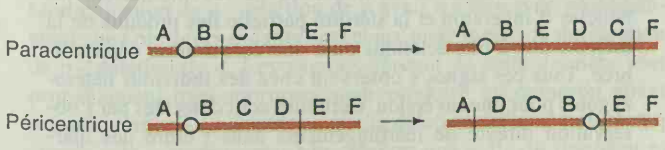


Figure 8-18. Les chromosomes d'un hétérozygote pour une inversion s'apparient en formant une boucle lors de la méiose. (a) Représentation schématique ; chaque chromosome est en fait constitué d'une paire de chromatides. (b) Micrographie électronique des chromosomes en synapsis à la prophase I de la méiose chez une souris hétérozygote pour une inversion paracentrique. Trois méiocytes différents sont représentés (Partie b de M.J. Moses, Département d'Anatomie, Centre Médical de Duke).

Nombre d'entre elles peuvent cependant le devenir et, de plus, certaines inversions s'observent dans des organismes haploïdes, indiquant clairement que dans ces cas au moins, la cassure n'intéresse pas une région essentielle.

La plupart des analyses d'inversions se pratiquent sur des hétérozygotes chez lesquels un chromosome est normal et son homologue porte l'inversion. Au microscope, l'observation de méioses chez de tels hétérozygotes révèle l'emplacement du segment inversé (figure 8-18) par le fait que l'un des chromosomes effectue un tour complet pour s'apparier avec l'autre dans la zone inversée ; autrement dit les deux homologues forment une **boucle d'inversion**.

C'est l'emplacement du centromère par rapport au segment inversé qui détermine le comportement génétique du chromosome. Si le centromère n'est pas inclus dans l'inversion, celle-ci est dite **paracentrique**. Si l'inversion englobe le centromère, on la qualifie de **péricentrique**.



Quelles sont les conséquences génétiques d'une inversion ? Dans le cas d'une inversion paracentrique à l'état hétérozygote, un crossing-over à l'intérieur de la boucle relie entre eux les centromères des deux homologues par un **pont dicentrique** et produit d'autre part un fragment de chromosome **acentrique**, c'est-à-dire dépourvu de centromère. Par conséquent, comme les chromosomes se séparent lors de l'anaphase I, les centromères en train de s'écarter resteront liés par le pont. Ceci oriente les centromères de telle manière que les chromatides non recombinées se retrouveront les plus éloignées. Le fragment acentrique ne peut s'aligner sur le fuseau ni se déplacer ; il est par conséquent perdu. Sous l'effet de la tension, le pont se rompra, formant deux chromosomes affectés de délétions terminales (figure 8-19). Les gamètes contenant de tels chromosomes peuvent être non viables mais même s'ils le restent, les zygotes qu'ils formeront ne le seront pas. Donc ici, le crossing-over, qui engendre normalement la classe recombinante

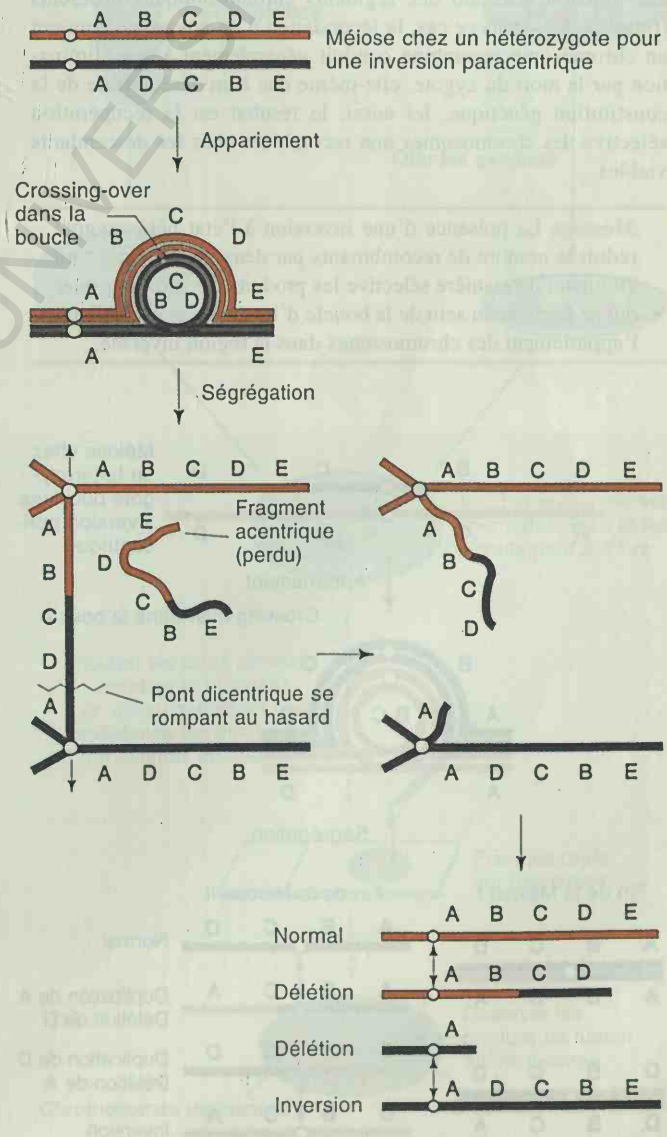


Figure 8-19. Produits méiotiques résultant d'un seul crossing-over à l'intérieur d'une boucle d'inversion paracentrique chez un hétérozygote. Le crossing-over se produit entre chromatides non-soeurs c'est-à-dire appartenant à des chromosomes différents.

BOUNCE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

parmi les produits de la méiose, donne naissance à des combinaisons létales. Le résultat global est une réduction de la fréquence de recombinaison (FR). Pour les gènes inscrits dans l'inversion la FR tombe en fait à zéro ; pour les gènes flanquants elle est réduite en proportion de la taille relative de l'inversion.

Les inversions affectent aussi la recombinaison d'une autre manière. En effet en cas d'inversion hétérozygote, l'appariement des chromatides semble poser souvent des problèmes mécaniques ; ceci aussi réduit la fréquence du crossing-over et de la recombinaison dans le voisinage de l'inversion.

L'effet génétique global d'une inversion péricentrique est le même que celui d'une inversion paracentrique (on ne recouvre pas les produits des crossing-over) — mais pour des raisons différentes. Dans le cas d'une inversion péricentrique, la disjonction des chromosomes recombinés s'effectue normalement, sans formation d'un pont, puisque les centromères sont contenus dans la région inversée. Cependant, un crossing-over à l'intérieur de cette région produit des chromatides qui contiennent une duplication et une délétion affectant des segments chromosomiques différents (figure 8-20). Dans ce cas, la fécondation d'un noyau qui contient un chromosome recombiné conduit généralement à son élimination par la mort du zygote, elle-même due à un déséquilibre de la constitution génétique. Ici aussi, le résultat est la récupération sélective des chromosomes non recombinés chez les descendants viables.

Message La présence d'une inversion à l'état hétérozygote réduit le nombre de recombinants par deux mécanismes : en éliminant de manière sélective les produits des crossing-over qui se forment au sein de la boucle d'inversion et en inhibant l'appariement des chromosomes dans la région inversée.

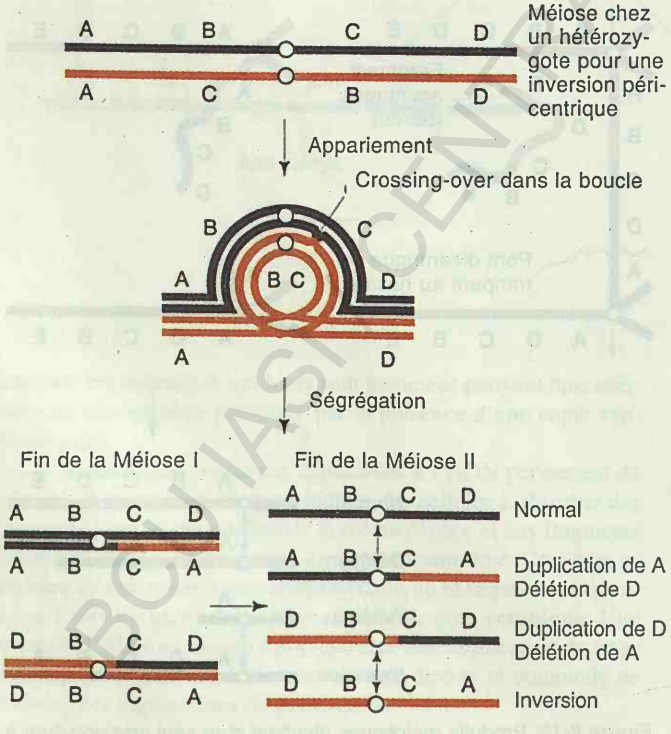


Figure 8-20. Produits méiotiques résultant d'un seul crossing-over à l'intérieur d'une boucle d'inversion péricentrique chez un hétérozygote.

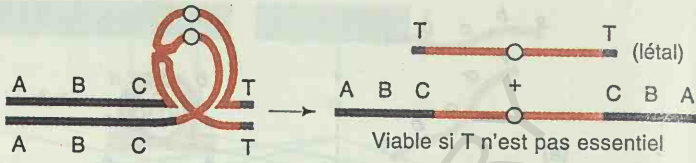
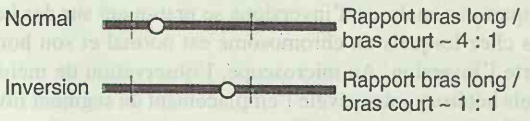


Figure 8-21. Formation d'une duplication non-tandem et viable à partir d'une inversion péricentrique proche d'une extrémité non essentielle du chromosome.

On notera que chez les inversions à l'état homozygote l'appariement des homologues et le crossing-over se font normalement, sans formation de ponts ; les produits méiotiques sont donc viables. Une conséquence intéressante, cependant : la carte de liaison du segment inversé le sera aussi.

Les généticiens utilisent les inversions pour créer des duplications de certaines régions chromosomiques. Par exemple, considérons une inversion péricentrique se terminant près d'une extrémité (T) du chromosome (figure 8-21). Un crossing-over dans la boucle produit une chromatide dont le bras gauche tout entier est dupliqué ; si l'extrémité n'est pas essentielle on crée ainsi une nouvelle lignée viable, disponible pour des expériences ultérieures. Une autre manière de produire une duplication (et aussi une délétion) fait usage de deux inversions paracentriques touchant des régions qui se recouvrent partiellement (figure 8-22). Il se forme un boucle compliquée ; un crossing-over au sein de l'inversion produit la duplication et la délétion. Ces manipulations ne sont possibles que chez des organismes dont la carte génétique est très bien connue et chez lesquels on dispose d'un large éventail de remaniements chromosomiques.

Nous avons vu que l'analyse génétique et l'observation cytologique des chromosomes méiotiques sont toutes deux des méthodes de choix pour détecter les inversions. Comme pour la plupart des remaniements, il est aussi possible de repérer les inversions par l'analyse des chromosomes mitotiques. Un changement dans le rapport des longueurs respectives des bras d'un chromosome est un trait particulièrement révélateur. Supposez que le chromosome ait muté de la façon suivante :



Notez que le rapport entre bras long et court passe d'environ 4 à 1 suite à une inversion péricentrique. Les inversions paracentriques qui ne modifient pas le rapport entre bras mais on peut les repérer au microscope par l'analyse des bandes ou par l'observation d'autres repères chromosomiques.

Message Les principaux signes diagnostiques des inversions sont la diminution de la fréquence de recombinaison, les boucles d'inversion et la stérilité partielle des produits de la méiose, due à des délétions ou à une constitution déséquilibrée. Tous ces signes s'observent chez des individus hétérozygotes pour une inversion. Certaines sont détectées par l'observation directe de réarrangements dans l'ordre des marqueurs chromosomiques.

BCU LAUSANNE CENTRALE UNIVERSITAIRE LIBRARY

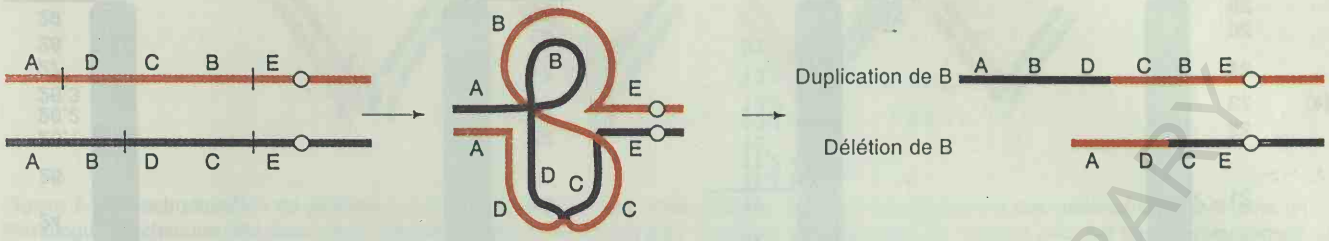


Figure 8-22. Formation d'une duplication non-tandem à partir de deux inversions dont les domaines respectifs se recouvrent partiellement.

On trouve des inversions chez 2 pourcent des êtres humains environ. Les porteurs hétérozygotes ont en général un phénotype normal mais produisent à la méiose les différentes combinaisons anormales que l'on s'attend à voir résulter de crossing-over au sein d'une boucle d'inversion. Considérons l'exemple des inversions péricentriques. Les individus qui sont hétérozygotes pour de telles inversions produisent une descendance où se retrouvent les anomalies prévisibles (duplications et délétions) ; les anomalies seront plus ou moins prononcées suivant la longueur des régions chromosomiques impliquées. Certains des phénotypes causés par des chromosomes affectés de duplications ou de délétions seront tellement anormaux que l'embryon n'arrivera pas à maturité ; ces combinaisons seront donc perdues par avortement spontané. Il existe cependant une approche permettant d'étudier des recombinants méiotiques anormaux indépendamment de leur éventuelle survivance jusqu'à terme. Lorsque des spermatozoïdes humains sont mis en contact avec des ovules non fécondés des hamster doré, ils y pénètrent mais sans toutefois les féconder. Le noyau spermatique ne fusionne pas avec celui de l'ovule et l'examen cytologique de telles cellules permet de reconnaître les chromosomes humains comme un groupe distinct (figure 8-23). Cette technique permet donc une observation directe des produits de la méiose chez le mâle et s'est avérée particulièrement utile pour suivre le comportement de certaines anomalies chromosomiques.

Considérons le cas d'un homme hétérozygote pour une inversion affectant le chromosome 3. Il s'agit d'une inversion de grande dimension devant permettre de fréquents crossing-over au sein de la boucle qui se forme à la méiose. Parmi les spermatozoïdes de cet homme, quatre types de chromosomes 3 étaient reconnaissables : normal, inversé et deux types recombinants (figure 8-24). Leurs fréquences respectives étaient les suivantes :

normal	38%
inversé	32%
duplication de q, délétion de p	17%
duplication de p, délétion de q	13%

La duplication de q - délétion de p avait été observée précédemment chez plusieurs enfants anormaux mais jamais la duplication de p - délétion de q. Les zygotes héritant de cette dernière sont probablement trop anormaux pour produire un embryon allant jusqu'à terme. Il semble donc que la délétion du long fragment q entraîne des conséquences plus sévères que celle du fragment p, plus petit.

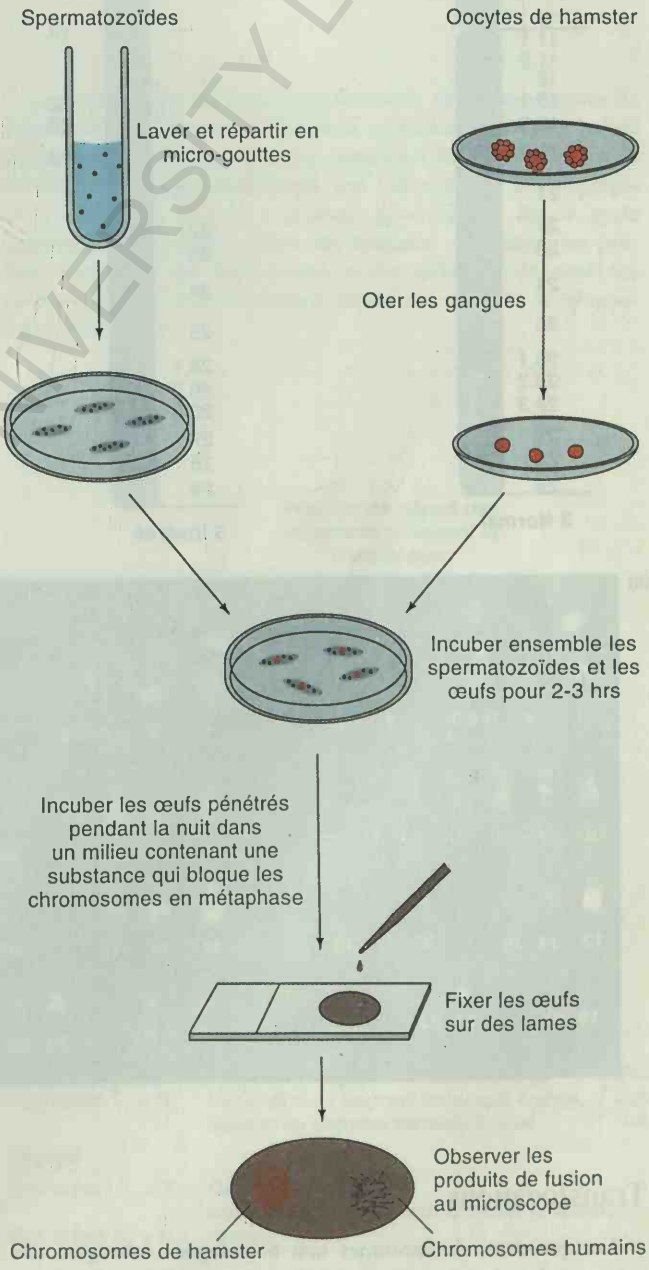


Figure 8-23. Fusion entre des spermatozoïdes humains et des oocytes de hamster dans le but d'étudier les produits méiotiques formés par des personnes de sexe masculin (adaptée de Renée Martin).

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

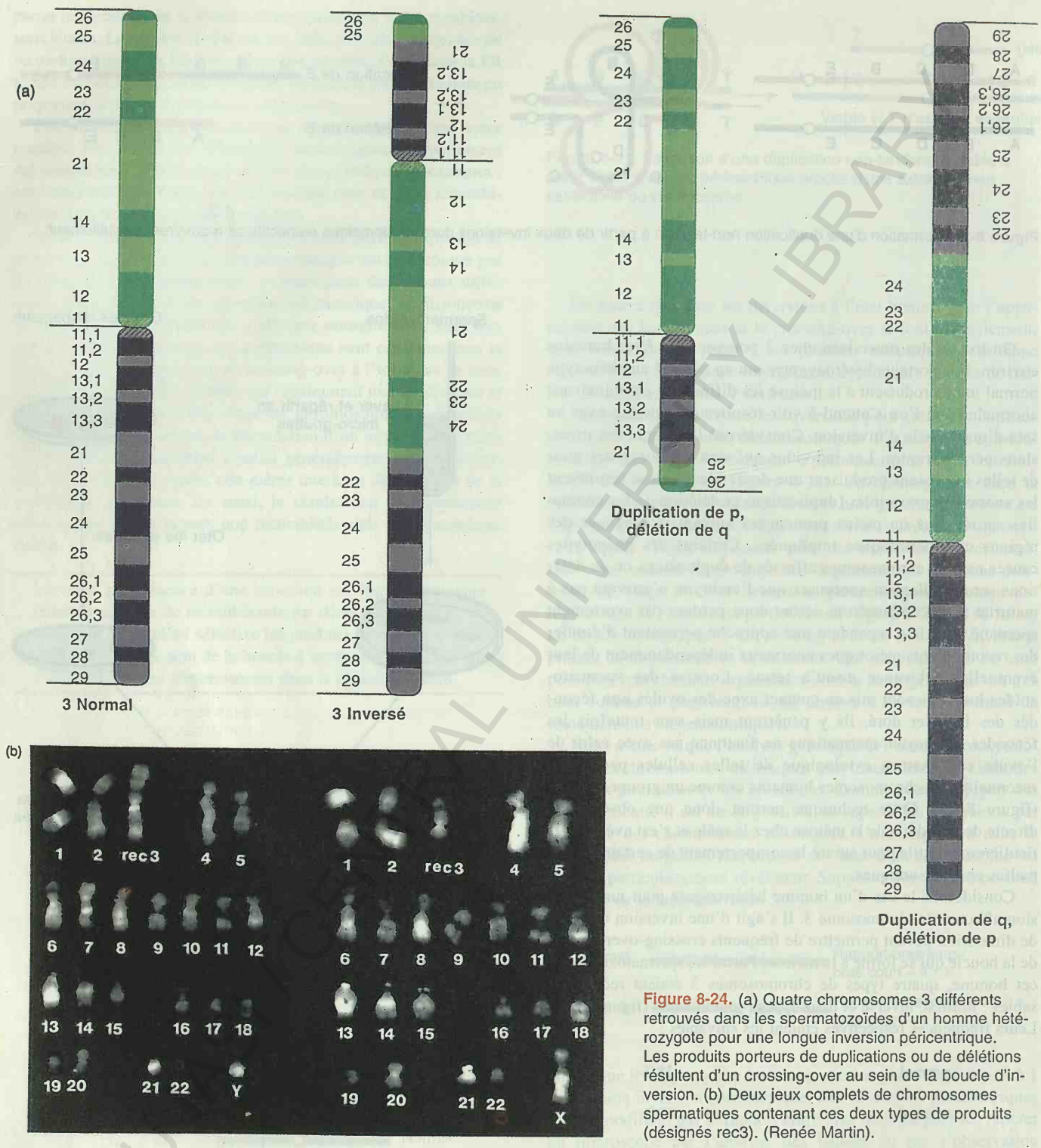


Figure 8-24. (a) Quatre chromosomes 3 différents retrouvés dans les spermatozoïdes d'un homme hétérozygote pour une longue inversion péricentrique. Les produits porteurs de duplications ou de délétions résultent d'un crossing-over au sein de la boucle d'inversion. (b) Deux jeux complets de chromosomes spermatiques contenant ces deux types de produits (désignés rec3). (Renée Martin).

Translocations

Lorsque deux chromosomes non homologues échangent des segments, les réarrangements produits sont appelés translocations. Nous ne considérerons ici que les **translocations réciproques,** qui sont les plus fréquentes. Un échange se produit entre deux segments appartenant à deux chromosomes hétérologues ce qui fait qu'en réalité deux translocations chromosomiques surviennent simultanément.

L'échange de segments entre chromosomes non homologues établit de nouvelles liaisons. Celles-ci se révèlent bien sûr si les chromosomes ainsi modifiés sont à l'état homozygote mais aussi, comme nous allons le voir, à l'état hétérozygote. En outre les translocations peuvent modifier considérablement la taille d'un

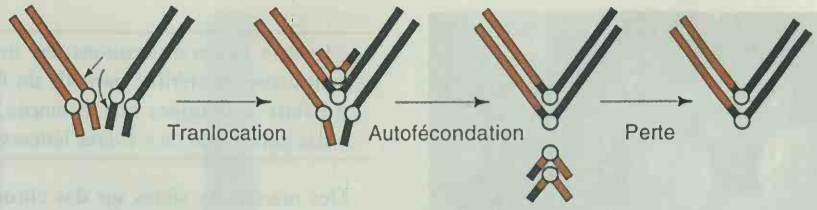
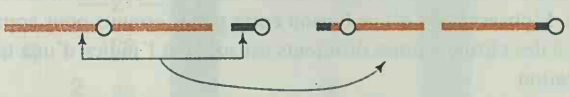


Figure 8-25. Restructuration du génome par des translocations. Les petites flèches indiquent l'emplacement des ruptures survenant dans un homologue de chacune des deux paires de chromosomes acrocentriques. Les brins se ressoudent de manière à former deux chromosomes métacentriques, un long et un court. Si une autofécondation s'ensuit (comme chez certaines plantes) certains descendants peuvent ne contenir qu'une paire de métacentriques longs et une paire de métacentriques courts. Dans des conditions adéquates le métacentrique court peut être perdu. Nous assistons donc à la conversion de deux paires de chromosomes acrocentriques en une paire de métacentriques.

chromosome aussi bien que la position de son centromère. Par exemple :

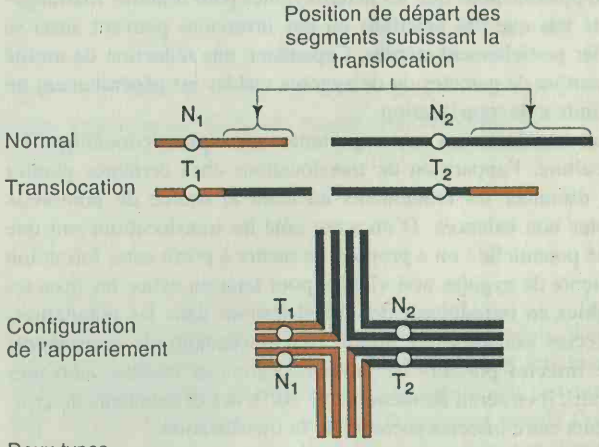


Dans le cas que voici, un long chromosome métacentrique est réduit de moitié, devenant ainsi acrocentrique, et le chromosome court s'allonge considérablement. Les populations naturelles présentent des exemples de telles modifications du nombre de chromosomes suite à une translocation entre deux chromosomes acrocentriques et la perte ultérieure des petits éléments de chromosome ainsi produits (figure 8-25).

Chez les hétérozygotes qui possèdent des chromosomes remaniés par translocation et des chromosomes normaux, les effets génétiques et cytologiques de cette situation sont importants. Ici aussi, l'affinité mutuelle des régions homologues est telle qu'elle impose une configuration caractéristique lorsque tous les chromosomes sont appariés lors de la méiose. Dans la figure 8-26, qui représente la méiose chez un hétérozygote pour une translocation réciproque, cette configuration prend la forme d'une croix.

Rappelez-vous que la configuration représentée sur cette figure se trouve à la plaque équatoriale du fuseau, les fibres de celui-ci étant perpendiculaires au plan de la page. Par conséquent la migration des centromères doit les entraîner respectivement au-dessus et au-dessous de celle-ci. Les paires de centromères homologues se disjoignent donc, qu'une translocation soit présente ou non. Comme la deuxième loi de Mendel s'applique aussi à des paires de centromères différentes, il en résulte deux modes de disjonction fréquents. La ségrégation de chacun des chromosomes de structure normale avec l'un des chromosomes remaniés (T_1 avec N_2 et T_2 avec N_1) se dénomme **ségrégation adjacente de type 1.** Ces produits sont tous deux porteurs de duplications et de déficiences affectant des régions différentes ; ils ne sont pas viables. Autre cas fréquent : les deux chromosomes normaux ségrègent ensemble ainsi que les parties réciproques des chromosomes remaniés (N_1 avec N_2 et T_1 avec T_2). C'est la **ségrégation dite alternée.** Ces produits sont viables. Comme les ségrégations adjacentes de type 1 et les ségrégations alternées se produisent avec la même fréquence, 50% des produits seulement seront viables, une condition appelée **semistérilité.** Il existe une autre possibilité, (**ségrégation adjacente de type 2**) en général assez rare, qui résulte de la migration des centromères homologues vers le même pôle .

La semistérilité est donc caractéristique des hétérozygotes de translocations. Elle ne se manifeste cependant pas de la même façon chez les plantes et chez les animaux. Chez les plantes les 50 pourcent de produits méiotiques non balancés dus aux ségrégations adjacentes de type 1 avortent généralement dès le stade gamétique (figure 8-27). Chez les animaux, cependant, les produits contenant des duplications et des délétions donnent des gamètes viables mais se révèlent létaux au cours du développement des zygotes.



Adjacente de type 1	Produits	
Vers le haut $T_1 + N_2$	Duplication du segment transloqué violet, délétion du segment transloqué orange	Souvent non viables
Vers le bas $T_2 + N_1$	Duplication du segment transloqué orange, délétion du segment transloqué violet	
Alternée		
Vers le haut $T_1 + T_2$	Génotype de translocation	Tous deux complets et viables
Vers le bas $N_1 + N_2$	Normal	

Figure 8-26. Les produits méiotiques résultant des deux modes de ségrégation chromosomique les plus fréquents chez un hétérozygote pour une translocation réciproque.

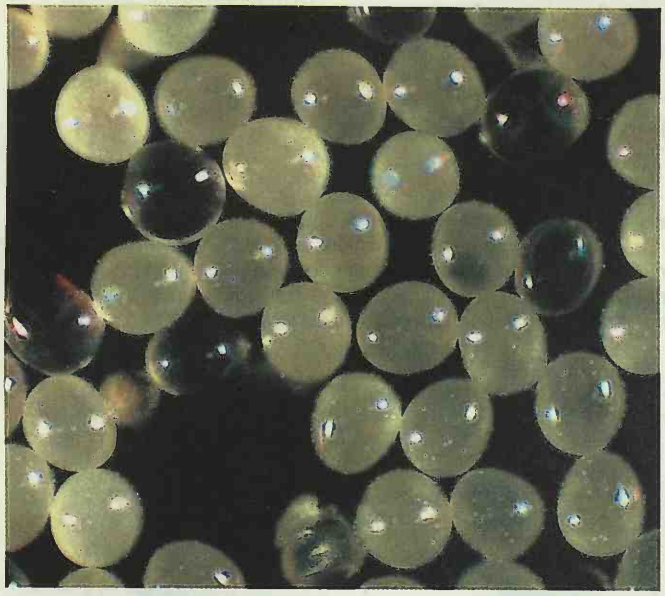


Figure 8-27. Photo de grains de pollen normaux et abortifs chez un plant de maïs semi-stérile. Les grains translucides contiennent des produits méiotiques déséquilibrés formés chez un hétérozygote pour une translocation réciproque. Les grains d'apparence normale, qui contiennent soit le génotype de translocation au complet, soit des chromosomes normaux peuvent féconder et donner naissance à un développement normal. (William Sheridan).

Rappelons-nous que les hétérozygotes pour d'autres réarrangements tels que des délétions ou des inversions peuvent aussi se révéler partiellement stériles. Cependant, une réduction de moitié du nombre de gamètes ou de zygotes viables est généralement un bon indice de translocation.

Les translocations sont importantes sur le plan économique. En agriculture, l'apparition de translocations chez certaines plantes peut diminuer les rendements en étant la source de nombreux zygotes non balancés. D'un autre côté les translocations ont une utilité potentielle : on a proposé de mettre à profit cette formation fréquente de zygotes non-viables pour tenir en échec les insectes nuisibles en introduisant des translocations dans les populations d'insectes sauvages. La moitié des descendants de croisements entre insectes porteurs de la translocation et insectes sauvages périrait ; il en serait de même pour 10/16 des descendants de croisements entre insectes porteurs de la translocation.

Message Les translocations, les inversions et les délétions sont cause de stérilité partielle du fait qu'elles génèrent des produits méiotiques non balancés qui peuvent avorter au stade gamétique ou s'avérer léthaux dans les zygotes.

Des marqueurs situés sur des chromosomes non homologues apparaîtront liés si ces chromosomes ont subi une translocation réciproque et que les marqueurs sont proches du point d'échange. La figure 8-28 illustre un cas de translocation hétérozygote établi en croisant un individu *aa bb* avec un autre porteur d'une translocation réciproque des gènes sauvages. Nous supposerons que *a* et *b* sont proches du point d'échange (dit aussi point de rupture). Si l'on soumet l'hétérozygote à un croisement-test, la seule descendance viable sera celle qui porte les génotypes parentaux de sorte que l'on observera une liaison entre des loci situés à l'origine sur des chromosomes différents. En fait, si les quatre bras de la figure d'appariement méiotique sont marqués génétiquement, l'analyse des recombinants devrait donner une carte de liaison cruciforme. L'observation d'une liaison entre gènes connus pour appartenir à des chromosomes différents est souvent l'indice d'une translocation.

Message Les translocations réciproques se manifestent génétiquement par la semistérilité et par la liaison de gènes originellement situés sur des chromosomes différents.

Il se produit des translocations chez l'homme ; habituellement on les retrouve toujours associées à un jeu de chromosomes normal dans un hétérozygote. La figure 8-29 montre un exemple impliquant les chromosomes 5 et 11. Les descendants de la personne porteuse de cette translocation révélaient une duplication du fragment 119 et une délétion du fragment 5p. Ces enfants montraient les symptômes du syndrome dû à la duplication de 11q. La combinaison réciproque n'a pas été observée.

Le syndrome de Down est généralement dû à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire n'ayant pas ségrégé de son homologue lors de la méiose (voir chapitre 9). Cependant, le syndrome de Down peut également survenir dans la descendance d'un individu hétérozygote pour une translocation affectant le chromosome 21. La personne hétérozygote est phénotypiquement normale et est appelée porteuse. Pendant la méiose, une ségrégation adjacente de type 1 produira des gamètes contenant des portions dupliquées du chromosome 21 et éventuellement une déficience pour une portion de l'autre chromosome impliqué dans la translocation. Le morceau supplémentaire de chromosome 21 est la

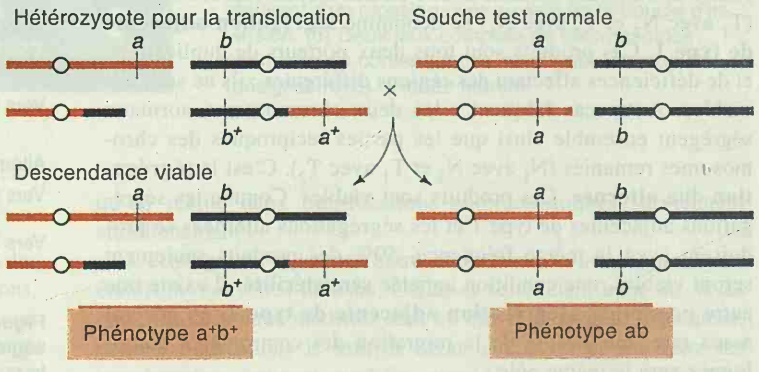


Figure 8-28. Lorsqu'un fragment ayant subi une translocation porte un gène identifiable, celui-ci peut montrer une liaison génétique apparente avec des gènes de l'autre chromosome parce que les génotypes recombinants (dans le cas présent a^+b et ab^+ se retrouveront dans des gamètes porteurs de délétions et de duplications, qui ne donneront pas de combinaisons viables.

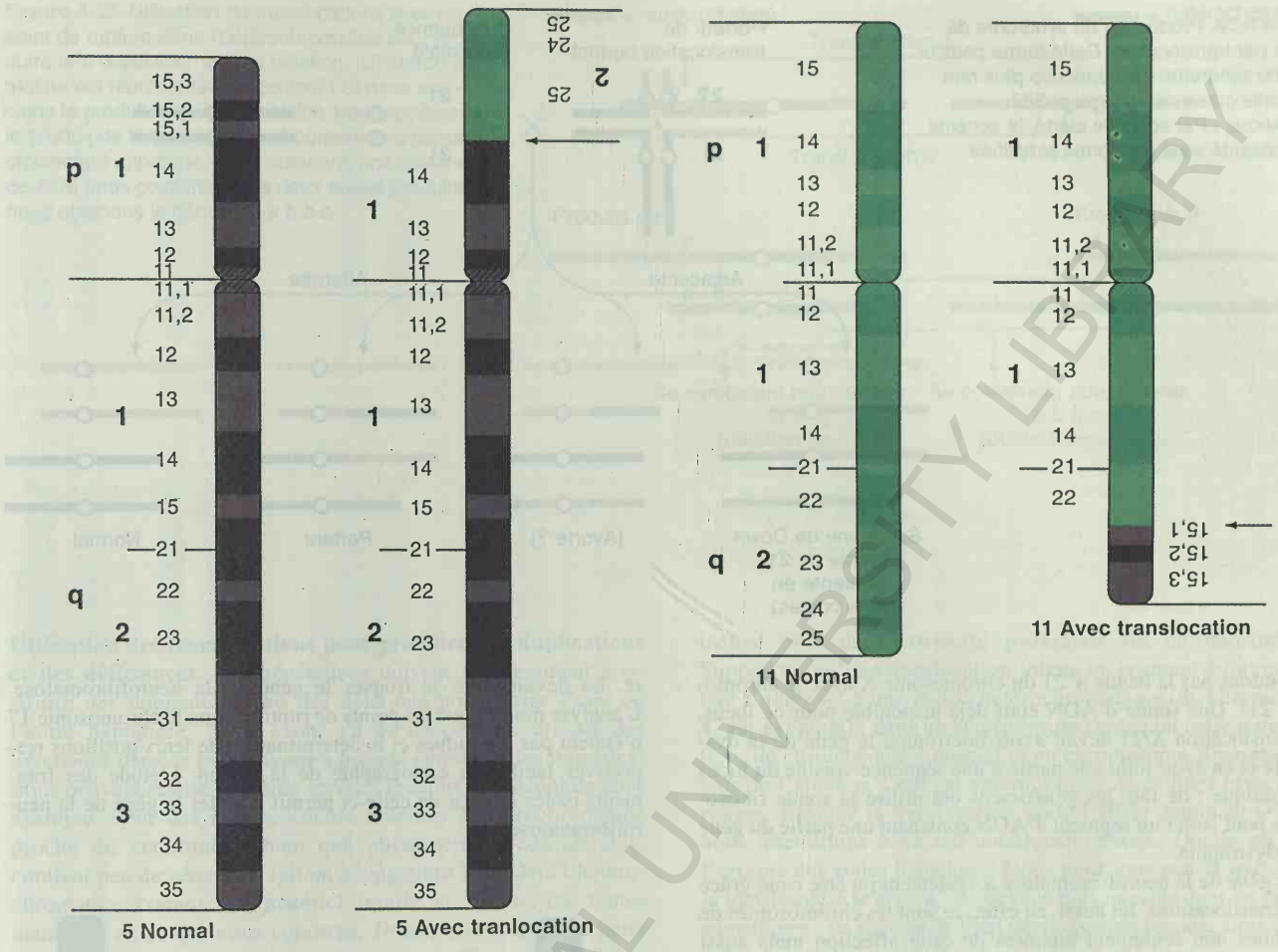


Figure 8-29. Hétérozygote pour une translocation réciproque des régions 5p et 11q (5p15 ; 11q23) chez l'Homme

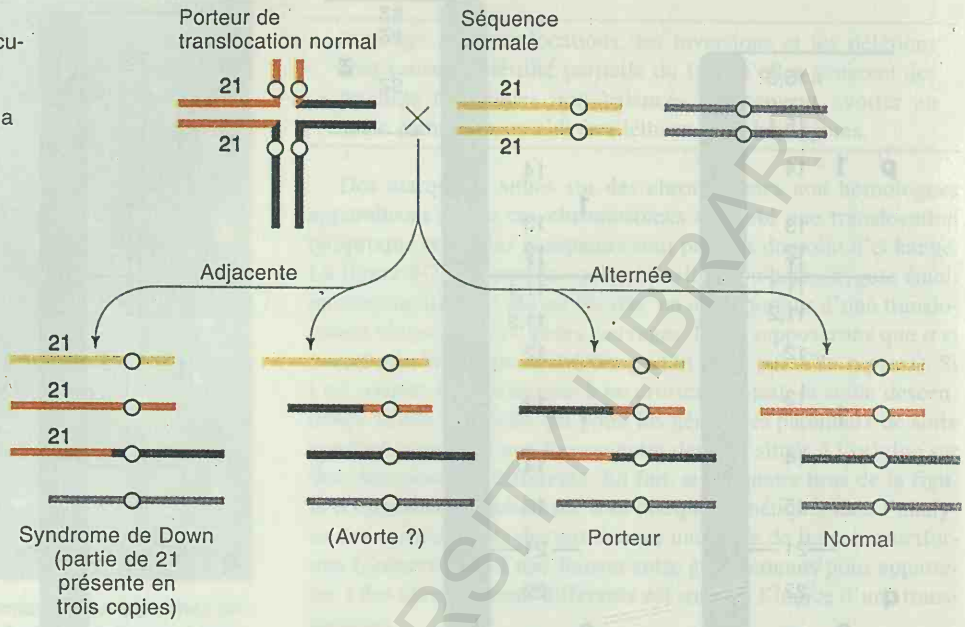
cause du syndrome de Down. La moitié des enfants normaux d'une personne porteuse seront des porteurs à leur tour (figure 8-30). Le mécanisme décrit plus haut prédit un fréquent retour du syndrome dans la généalogie d'une famille affectée : un hétérozygote pour la translocation (ou porteur) peut engendrer plusieurs enfants manifestant le syndrome et, bien sûr, les enfants porteurs peuvent faire de même au cours des générations ultérieures. L'autre mécanisme est sporadique et ne produit *pas* d'effets récurrents au sein d'une même famille. L'origine de bien d'autres affections héréditaires remonte à des translocations présentes chez les parents à l'état hétérozygote.

Des translocations apparaissent aussi dans des cellules cancéreuses ; la figure 8-31 en montre quelques exemples observés dans des tumeurs solides. Dans ces dernières les translocations ne sont pas aussi fréquentes que les délétions. Comme pour d'autres réarrangements observés dans des cellules cancéreuses leur relation avec le phénotype cancéreux n'est en général pas claire. Nous verrons cependant plus loin un exemple où la relocalisation d'un oncogène déterminé semble être la cause d'un cancer.

Les translocations, ainsi que d'autres réarrangements, peuvent interrompre la continuité d'un gène. Celui-ci est dès lors inactivé et se comporte comme un gène muté. Lees généticiens peuvent utiliser cet effet pour localiser des gènes humains et ensuite l'isoler. Par exemple, ce sont les indications fournies par des translocations qui ont permis d'isoler le gène de la dystrophie musculaire de Duchenne. Certains cas assez rares de cette maladie s'observent chez des femmes qui sont hétérozygotes pour des translocations entre le chromosome X et divers autosomes. Le point de rupture dans le chromosome X se situe toujours dans la bande Xp21 indiquant donc l'emplacement du gène de la dystrophie qu'on savait déjà localisé sur le chromosome X. La chasse au gène en question pouvait dès lors commencer en visant cette région du chromosome. Notons en passant que l'expression du phénotype mutant chez une femme devait être due à l'inactivation du chromosome X normal (voir figure 8-32 et page 73).

L'un des points de rupture autosomiques s'avéra utile en tant que marqueur moléculaire pour le gène de la dystrophie. Il se trouvait dans le locus de l'ARN ribosomique du chromosome 21 (ne

Figure 8-30. Production du syndrome de Down par translocation. Cette forme particulière du syndrome est beaucoup plus rare que celle présentée à la page 262. (REMARQUE : Par souci de clarté, le schéma est présenté sous une forme simplifiée.



confondons pas la bande n°21 du chromosome X avec le chromosome 21). Une sonde d'ADN était déjà disponible pour ce locus. La translocation X/21 devait avoir interrompu le gène de la dystrophie et en avoir joint une partie à une séquence voisine du locus ribosomique ; de fait, les généticiens ont utilisé la sonde ribosomique pour isoler un segment d'ADN contenant une partie du gène de la dystrophie.

Le gène de la neurofibromatose a également pu être isolé grâce à des translocations. Ici aussi, en effet, ce sont les chromosomes de personnes non seulement atteintes de cette affection mais aussi porteuses de translocations, qui fournirent le matériau crucial. Toutes les translocations présentaient l'un de leurs points de rupture dans le chromosome 17, dans une bande proche du centromère. Là devait donc se trouver le gène de la neurofibromatose. L'analyse montra que les points de rupture dans le chromosome 17 n'étaient pas identiques et la détermination de leurs positions respectives facilita la cartographie de la région. L'étude des fragments isolés à partir de celle-ci permit d'isoler le gène de la neurofibromatose.

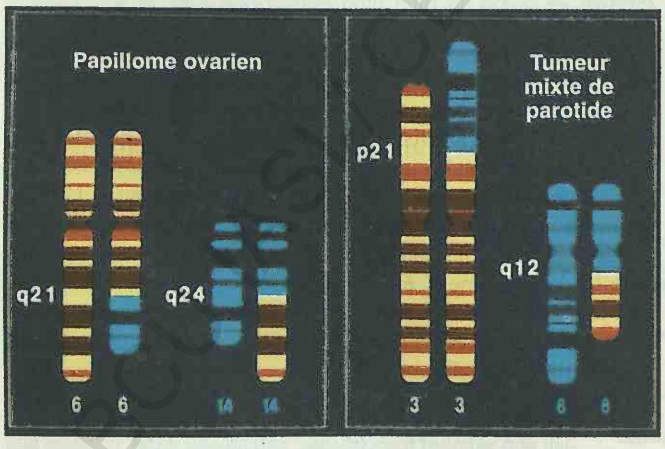


Figure 8-31. Translocations retrouvées systématiquement dans plusieurs types de tumeurs solides chez l'Homme. Les numéros des bandes indiquent les points de rupture récurrents. (Jorge Yunis).

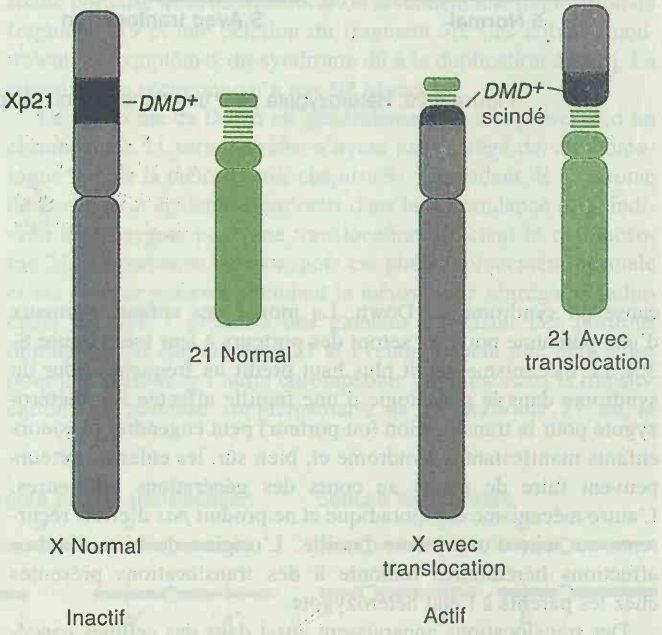


Figure 8-32. Schéma des chromosomes d'une femme affectée de la dystrophie musculaire de Duchenne et hétérozygote pour une translocation réciproque entre les chromosomes X et 21. La translocation a interrompu l'un des deux allèle *DMD*⁺ et l'inactivation du chromosome X a rendu l'autre non fonctionnel.

DOCUMENT UNIVERSITY LIBRARY

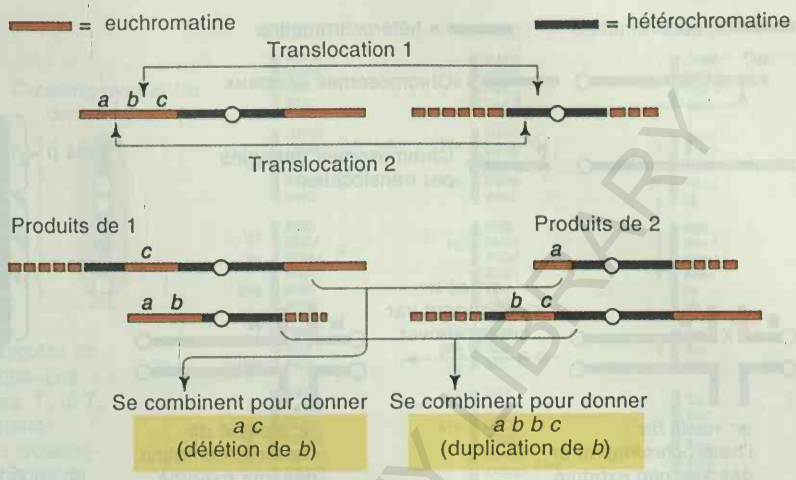


Figure 8-33. Utilisation de translocations avec un point de rupture dans l'hétérochromatine pour produire une duplication et une délétion. (L'hétérochromatine est représentée en couleur.) Si nous associons le produit de la translocation 1 porteur de *c* et le produit de la translocation 2 porteur de *a* par un croisement approprié, nous obtenons une délétion de *b*. Si nous combinons les deux autres produits, nous obtenons le génotype *a b b c*.

Utilisation des translocations pour produire des duplications et des déficiences. Les généticiens doivent fréquemment construire des duplications ou des délétions pour tester l'une ou l'autre hypothèse. Nous avons vu qu'ils peuvent utiliser des inversions dans ce but. Voyons à présent comment des translocations peuvent rendre le même service. Prenons la drosophile pour exemple. Pour des raisons encore obscures l'hétérochromatine proche du centromère, bien que physiquement considérable, contient peu de gènes. En fait on a longtemps considéré l'hétérochromatine comme un matériel inutile et inerte. De toutes manières, en ce qui nous concerne, *Drosophila* tolère une perte ou un excès d'hétérochromatine sans grand effet sur sa viabilité ou sa fertilité.

Prenons maintenant deux translocations réciproques différentes mais impliquant la même paire de chromosomes. Chacune d'entre elles possède un point de rupture dans l'hétérochromatine et un autre d'un côté ou de l'autre de la région que nous désirons dupliquer ou supprimer. (figure 8-33). La figure montre bien que si nous disposons d'une vaste collection de translocations possédant des points de rupture hétéro- et euchromatiques en des sites différents, nous serons en mesure de construire à volonté des duplications et des délétions de nombreuses parties du génome, à diverses fins expérimentales. Plus généralement, si l'un des points de rupture d'une translocation est proche d'une extrémité chromosomique non essentielle à la survie, la duplication ou la délétion de celle-ci est sans importance et la translocation peut fournir une méthode pour générer des duplications ou des déficiences affectant l'autre segment transloqué.

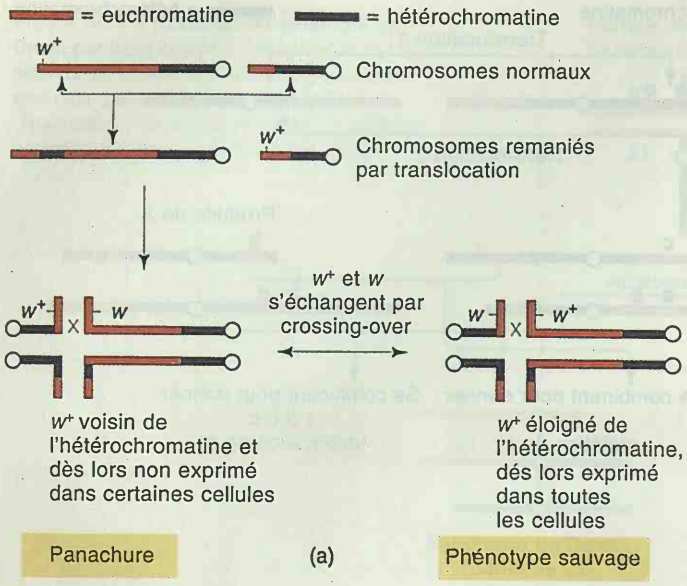
Panachures dues à des effets de position. Dans les chapitres précédents, nous avons envisagé plusieurs manières de produire des panachures dans les cellules somatiques d'un organisme multicellulaire, soit la ségrégation somatique, le crossing-over somatique et la mutation somatique. Les translocations sont une cause supplémentaire de tels effets, à savoir les **panachures par effet de position.**

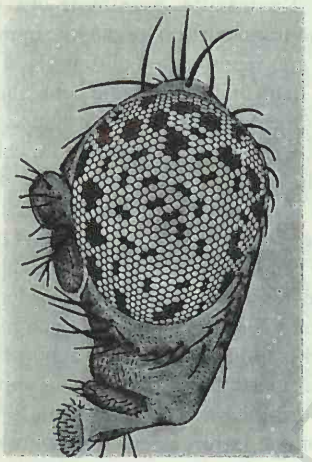
Le locus responsable de la dépigmentation oculaire observée chez les mouches à yeux blancs chez *Drosophila* (locus white) se trouve près de l'extrémité proximale du chromosome X. Supposons qu'une translocation joigne un segment terminal portant l'allèle w^+ à une région hétérochromatique (du chromosome 4, par exemple) ; dans un hétérozygote contenant cette translocation, un chromosome 4 normal et un chromosome X normal porteur de l'allèle *w*, l'œil est une mosaïque de cellules blanches et rouges. Puisque la translocation porte l'allèle dominant w^+ nous nous attendrions à un œil entièrement rouge. Quelle est alors l'origine des zones blanches ? Nous pourrions penser que suite à la translocation le gène w^+ est devenu plus mutable dans les cellules somatiques ; les régions de l'œil dépigmentées seraient alors constituées de cellules ou l'allèle w^+ a muté vers une forme *w*.

En 1972, Burke Judd a testé cette hypothèse en transférant l'allèle w^+ du chromosome remanié sur un chromosome X normal et l'allèle *w* originaire de ce dernier sur le segment remanié (figure 8-34). Comme les organismes porteurs de cette nouvelle configuration avaient des yeux rouges, il était clair que le gène w^+ n'était pas défectif. Lorsque Judd retransféra w^+ sur le segment remanié, la panachure de l'œil réapparut. Nous pouvons dès lors conclure que le gène w^+ inclus dans la translocation ne s'exprime pas dans certaines cellules où dès lors seul l'allèle *w* se manifeste. On parlera donc de panachure due à un effet de position puisqu'il s'agit d'une situation où l'expression d'un gène devient instable à la suite du changement de position qui résulte du remaniement.

On retrouve de tels effets de position dans certains cancers provoqués par des translocations. Par exemple, le lymphome de Burkitt (un cancer de certaines cellules humaines productrices d'anticorps, les cellules B) est dû dans la plupart des cas au transfert d'un gène susceptible de provoquer un cancer (oncogène) dans le voisinage d'une région qui active l'expression des gènes producteurs d'anticorps (figure 8-35). L'oncogène lui-même est alors activé ce qui déclenche le développement d'un cancer.

Message La position d'un gène dans le génome peut influencer son expression.





(b)

Figure 8-34. Panachure causée par un effet de position. (a) La translocation de w^+ vers un emplacement proche de l'hétérochromatine provoque une déficience fonctionnelle de ce gène dans certaines cellules ; c'est ce phénomène qui est responsable de la panachure. (b) Aspect de l'œil de *Drosophila* montrant ce type d'effet. (Illustration (b) aimablement transmise par Randy Mottus.)

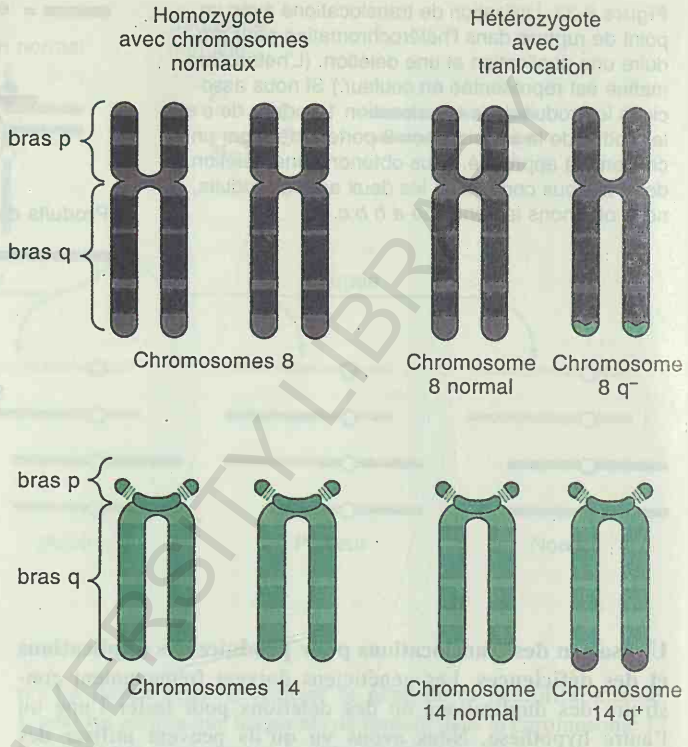


Figure 8-35. La translocation réciproque entre les chromosomes 8 et 14 qui est à l'origine de la majorité des cas de lymphome de Burkitt. Un oncogène situé à l'extrémité proximale du chromosome 8 est déplacé sur le chromosome 14 dans le voisinage de la région activatrice d'un gène producteur d'anticorps.

Mise en évidence de réarrangements par analyse de tétrades

Chez les champignons l'analyse des tétrades peut s'avérer très utile lorsqu'il s'agit de dépister des aberrations. Chez *Neurospora,* par exemple, tout génome contenant une délétion produira une ascospore immature qui ne noircira pas comme une spore normale et se révèlera incapable de croître ; les parents de croisements qui produisent en quantité de telles ascospores blanches abortives recèlent habituellement des remaniements (les duplications donnent généralement naissance à des spores noires *viables*).

Certains profils de distribution des spores abortives sont spécifiques du type de remaniement parental. Par exemple, une translocation produira trois types d'asques mais dans certaines proportions. La plupart auront soit 8 spores noires (originaires de ségrégations alternées) ou blanches (originaires de ségrégations adjacentes de type 1. Quelques-unes présenteront quatre spores noires et quatre blanches, produits de crossing-over entre chacun des centromères et le point de rupture de la translocation (figure 8-36).

Réarrangements chromosomiques au cours de l'évolution

Au début de ce chapitre, nous avons noté que les remaniements chromosomiques avaient influencé le cours de l'évolution. Il est donc intéressant de comparer les chromosomes d'espèces différentes. Si l'on effectue une telle comparaison entre chromosomes de primates, ce qui frappe d'emblée, ce sont les ressemblances. La figure 8-37 montre les profils de bandes chez l'Homme, le chimpanzé, le gorille et l'orang-outan. Notons qu'une translocation revenant à fusionner deux chromosomes complets a produit le chromosome 2 chez l'Homme.

Lorsqu'on compare des organismes moins voisins, on constate des remaniements plus importants, tels qu'en montre la figure 8-38 qui schématise la disposition des loci chromosomiques chez trois mammifères. Les comparaisons intergénériques font apparaître plusieurs translocations. On notera cependant un degré de conservation important, ce qui pourrait refléter soit une nécessité fonctionnelle de la liaison entre certains loci, soit le temps relativement court écoulé depuis la divergence.

MCGILL UNIVERSITY LIBRARY

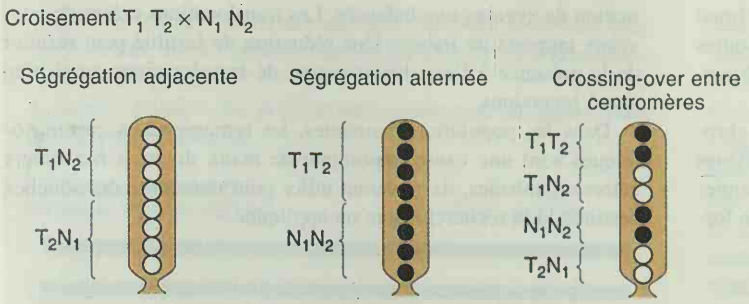


Figure 8-36. Différents profils d'asques produits par des zygotes de *Neurospora* hétérozygotes pour une translocation réciproque. Les spores sexuelles blanches avortent ; les noires sont viables. T_1 et T_2 représentent les chromosomes remaniés, N_1 et N_2 les chromosomes normaux. Le profil 4 noires-4 blanches résulte d'un crossing-over entre l'un ou l'autre des centromères et le point d'échange de la translocation.

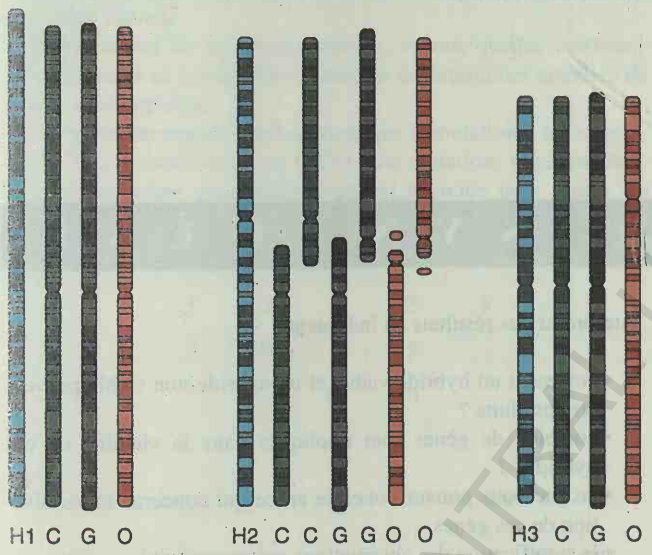


Figure 8-37. Similitudes et différences entre les chromosomes 1,2 et 3 de l'Homme (H), du chimpanzé (C), du gorille (G) et de l'orang-outan (O). (D'après J.J. Yunis, *Sciences*, 215, 1982, 1525).

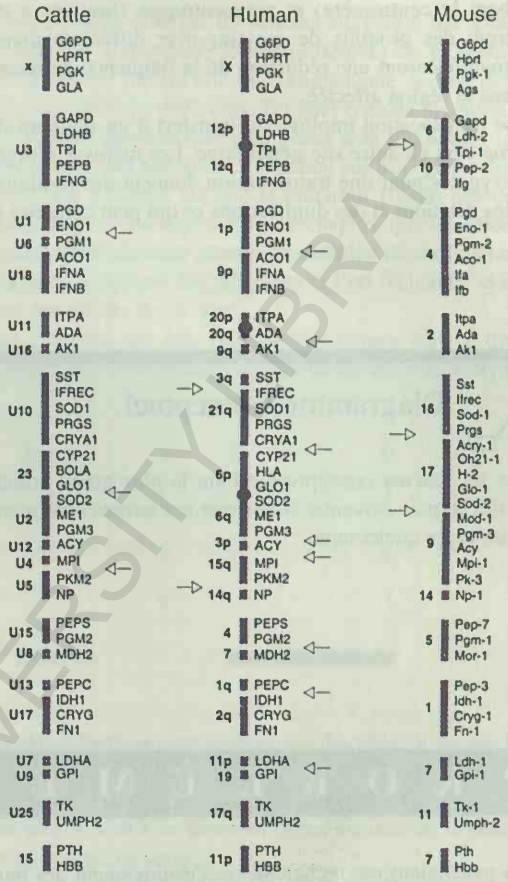


Figure 8-38. Alignement des cartes génétiques de la vache, de l'Homme et de la souris montrant les positions conservées par des gènes équivalents. Les noms des chromosomes sont à gauche et ceux des gènes à droite. Les flèches indiquent des points de translocation supposés. D'après S.J. O'Brien et H.N. Sevanez, *Annual Review of Genetics*, 22, 1988, 323).

ROUSSI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

RÉSUMÉ

La morphologie des chromosomes permet de les identifier. Parmi les caractéristiques utiles, notons la taille, la position du centromère, la position de l'organisateur nucléolaire, la disposition des chromomères, de l'hétérochromatine et des bandes.

Le jeu de chromosomes encourt spontanément des remaniements (le sujet de ce chapitre) ou des changements numériques. Les uns et les autres sont appelés mutations chromosomiques.

Les quatre types d'anomalies structurales des chromosomes sont les délétions, les duplications, les inversions et les translocations. Les délétions correspondent à la disparition d'un fragment de chromosome. Si celui-ci est d'importance vitale l'homozygote correspondant sera létal. Les délétions hétérozygotes peuvent être létales ou non et peuvent conduire à l'expression des gènes récessifs qu'elles démasquent.

Les duplications peuvent causer un déséquilibre du matériel génétique et par là manifester un phénotype. Cependant on sait par de nombreux exemples, chez l'homme en particulier, que les duplications peuvent accroître l'éventail des fonctions génétiques. En d'autres termes les duplications peuvent servir de matière première à l'évolution.

Une inversion nécessite une rotation de 180° d'un fragment de chromosome. A l'état homozygote les inversions n'ont que peu d'effet, à moins que l'hétérochromatine ne soit mise en jeu et qu'il en résulte un effet de position ou qu'un gène soit interrompu. Par contre les hétérozygotes pour une inversion connaissent souvent des difficultés d'appariement à la méiose et il peut se former une boucle d'inversion. Un crossing-over à l'intérieur de la boucle donne des produits non-viables. Les inversions péricentriques (qui

englobent le centromère) et paracentriques (limitées à un bras) donneront des produits de crossing-over différents mais toutes deux manifesteront une réduction de la fréquence de recombinaison dans la région affectée.

Une translocation implique le transfert d'un segment de chromosome vers un autre site génomique. Les méioses d'organismes hétérozygotes pour une translocation donnent des produits contenant des délétions et des duplications ce qui peut conduire à la formation de zygotes non balancés. Les translocations créent de nouveaux rapports de liaison. Une réduction de fertilité peut résulter de la présence à l'état hétérozygote de translocations aussi bien que d'inversions.

Dans les populations humaines, les remaniements chromosomiques sont une cause importante de maux divers. Chez divers autres organismes, ils s'avèrent utiles pour construire des souches destinées à la recherche pure ou appliquée.

Diagramme conceptuel

Tracer un schéma conceptuel reliant le plus grand nombre possible des termes suivants. Noter que ces termes sont mentionnés dans un ordre quelconque.

génome / délétion / boucles / duplication / appariement/fréquence de recombinaison / hétérozygotes / inversions / létalité / rapports phénotypiques.

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Des généticiens ont recherché systématiquement des mutations récessives et léthales touchant le chromosome 2 de *Drosophila* et en ont obtenu dix. Ils ont alors croisé des individus porteurs de ces mutations de manière à produire des zygotes hybrides dont chacun porte un chromosome létal provenant d'une souche et un chromosome létal provenant d'un autre, dans le but de déterminer la viabilité de ces hybrides. Les résultats suivants furent obtenus, le signe plus indiquant la viabilité

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	–	+	–	+	+	+	–	+	+	+
2		–	+	+	+	+	+	+	+	–
3			–	+	+	+	–	+	+	+
4				–	+	–	+	+	+	–
5					–	+	+	+	–	–
6						–	+	+	+	–
7							–	+	+	+
8								–	+	+
9									–	–
10										–

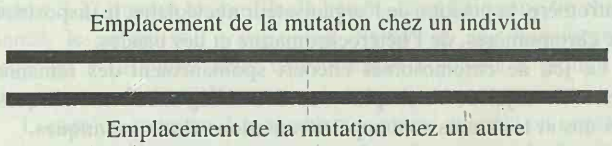
Interprétez ces résultats en indiquant

- comment un hybride viable et un hybride non viable peuvent être produits ?
- combien de gènes sont impliqués dans la viabilité de ces hybrides ?
- ce que vous pouvez conclure en ce qui concerne la localisation de ces gènes.
- la signification des observations qui pourraient à première vue vous paraître incompatibles avec le schéma émergeant de votre analyse.

Solution

Tout d'abord reformulons le système analysé : dans chaque croisement, les généticiens assemblent dans un hybride deux chromosomes homologues dont chacun porte une mutation létale. A priori, plusieurs situations se présentent à l'esprit.

En premier lieu, les mutations pourraient être des altérations ponctuelles du même gène :

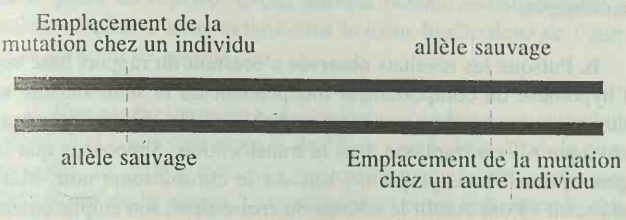


Dans ce cas nous nous attendons à ce que le génotype hybride soit létal d'après ce que nous avons appris au chapitre 4 sur les allèles

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

récessifs et léthaux. Certaines des non-viabilités observées peuvent donc être due à l'appariement de mutations ponctuelles affectant le même gène.

Autre possibilité, les deux mutations affectent des gènes différents du chromosome 2 :



Comme nous savons que les mutations sont récessives, ce qui implique la dominance des allèles sauvages correspondants, nous nous attendons à ce que cet hybride soit viable. En fait, au chapitre 4, nous avons appelé ces compensations mutuelles d'allèles respectifs par leurs allèles sauvages «complémentation génétique». Le schéma ci-dessus pourrait donc expliquer certains des hybrides viables.

Nous aidant de ces considérations, voyons quelles mutations appartiennent au même gène et tentons de déterminer combien de gènes sont impliqués.

La première rangée nous apprend que la mutation 1 ne complémente pas les mutations 3 et 7. Ces trois mutations semblent donc affecter le même gène. Effectuant cet exercice pour toutes les mutations nous arrivons à la grille suivante où chaque colonne regroupe les mutations paraissant toucher le même gène :

1	2	4	5	8
3	10	6	9	
7		10	10	

Nous voyons donc émerger un schéma suggérant que cinq gènes sont concernés. Cependant, le comportement de la mutation 10 pose un problème puisqu'elle ne complémente aucune des mutations de trois groupes différents. De quel type de mutation peut-il s'agir ? Si nous pensons que cinq gènes sont impliqués, la mutation 10 doit être une altération s'étendant sur trois gènes distincts ; une possibilité évidente est que la mutation 10 soit une délétion. D'ailleurs nous avons appris dans ce chapitre que les délétions se comportent généralement comme des allèles récessifs létaux ; on s'attend donc à trouver des délétions si l'on recherche systématiquement des allèles de ce type.

Nous pouvons dès lors représenter comme suit ce que nous avons appris sur le chromosome 2 au terme de cette analyse :

Gènes	*A*	*B*	*C*	*D*	*E*
	1	2	4	5	8
	3		6	9	
	7				
Délétion					

Notons cependant que cette disposition des gènes n'est pas la seule possible ; nous n'avons aucune indication sur les localisations respectives de *B,C* et *D* au sein de la région délétée et nous ne savons pas non plus si *A* et *E* se trouvent du même côté de la délétion ou de part et d'autre de celle-ci.

Noter les concepts utilisés dans cette analyse ; dominance et récessivité (chapitre 2), complémentation (chapitre 4), mutation génique (chapitre 7) et délétion (le présent chapitre).

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Considérez une plante de maïs hétérozygote pour une translocation réciproque et donc semi-stérile. Cette plante est croisée en retour avec une souche normale homozygote pour le gène «brachytique» *b*, situé sur le chromosome 2. On croise alors en retour un plant semi-stérile de la F_1 avec la souche brachytique homozygote. La descendance obtenue contient les phénotypes suivants :

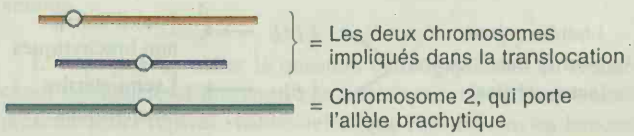
Non brachytiques		Brachytiques	
Semi-stérile	Fertile	Semi-stérile	Fertile
334	27	42	279

a. A quel rapport vous attendez-vous si le chromosome porteur du caractère brachytique n'est pas impliqué dans la translocation ?

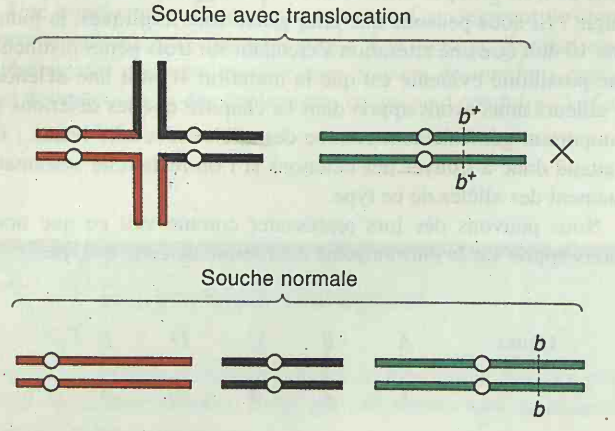
b. Pensez-vous que le chromosome 2 est impliqué dans la translocation ? Justifiez votre réponse en décrivant la conformation des chromosomes pertinents de la F_1 semi-stérile et en expliquant les nombres de descendants obtenus.

Solution

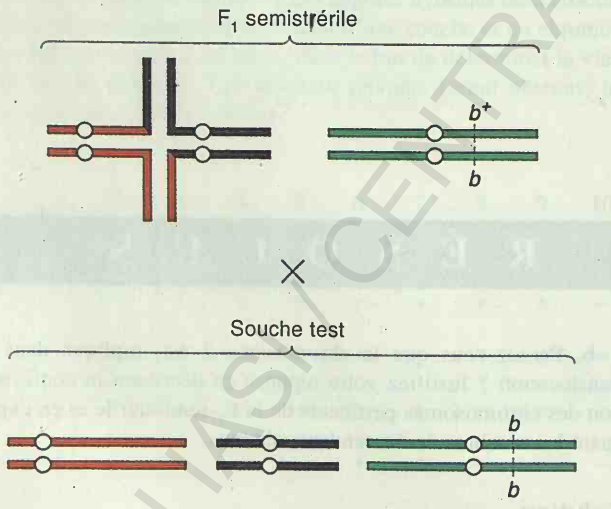
a. Pour procéder avec méthode, commençons par représenter les données sous la forme du diagramme suivant :



Pour simplifier le diagramme nous ne représenterons pas la subdivision des chromosomes en chromatides :



Toute la descendance de ce croisement sera hétérozygote pour le chromosome brachytique, mais qu'en sera-t-il des chromosomes impliqués dans la translocation ? Dans ce chapitre, nous avons vu que seuls les produits de la ségrégation alternée survivent et qu'une moitié de ces survivants aura des chromosomes normaux tandis que l'autre portera les deux chromosomes remaniés. La combinaison remaniée reformera un hétérozygote pour la translocation lorsqu'elle s'associera au jeu de chromosomes du parent normal. Ce dernier type — celui de la F_1 semi-stérile — est représenté ci-dessous comme partenaire dans le croisement avec la souche parentale brachytique :



Dans nos prédictions concernant la descendance de ce croisement, nous pouvons considérer le comportement des chromosomes remaniés indépendamment de la paire qui porte le gène brachytique. Les prédictions peuvent dès lors s'énoncer comme suit :

$\frac{1}{2}$ hétérozygotes pour la translocation (semi-stériles) → $\frac{1}{2}$ b^+b → $\frac{1}{4}$ semi-stériles non brachytiques

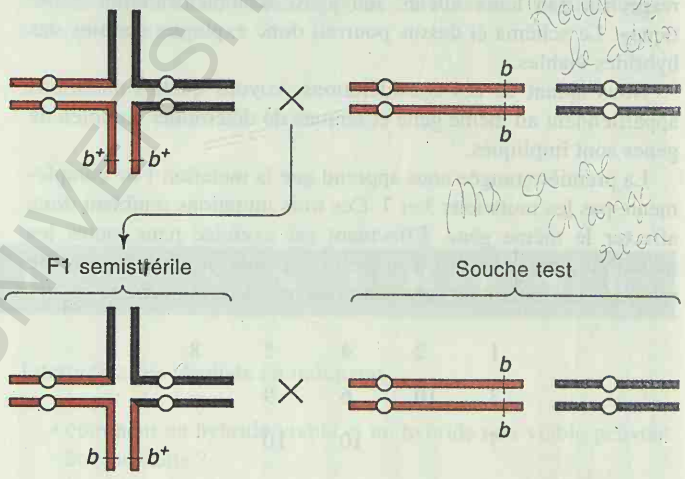
$\frac{1}{2}$ hétérozygotes pour la translocation (semi-stériles) → $\frac{1}{2}$ bb → $\frac{1}{4}$ semi-stériles brachytiques

$\frac{1}{2}$ normaux (fertiles) → $\frac{1}{2}$ b^+b → $\frac{1}{4}$ fertiles non brachytiques

$\frac{1}{2}$ normaux (fertiles) → $\frac{1}{2}$ bb → $\frac{1}{4}$ fertiles brachytiques

Le rapport 1 : 1 : 1 : 1 ainsi prédit est nettement différent du résultat observé.

b. Puisque les résultats observés s'écartent du rapport basé sur l'hypothèse du comportement indépendant de la semi-stérilité et du phénotype brachytique, il est probable que le chromosome brachytique (2) *est* impliqué dans la translocation. Supposons que le gène récessif brachytique (*b*) soit sur le chromosome noir. Mais alors, où ? Pour établir le schéma du croisement, son emplacement exact importe peu, bien que dans la réalité, les proportions relatives des classes de descendants en dépendent. Si nous supposons que *b* se trouve près de l'extrémité du fragment transféré, nous pouvons retracer le pedigree comme suit :

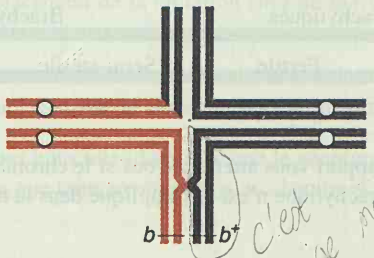


Si les chromosomes de la F_1 semi-stérile ségrègent à partir de cette configuration nous pouvons prédire

$\frac{1}{2}$ fertiles brachytiques

$\frac{1}{2}$ semi-stériles non brachytiques

La plupart des descendants sont en effet de ce type ; nous devons donc être sur la bonne voie. Quelle est l'origine des deux classes minoritaires ? Pour les expliquer, nous devons faire passer b^+ sur le chromosome noir normal et *b* sur le fragment transféré. Ceci doit s'être produit par un crossing-over entre le point de rupture des fragments échangés (au centre de la figure cruciforme) et le locus brachytique. Pour représenter cet événement, nous devons dessiner les chromatides puisque c'est à leur niveau que se produisent les crossing-over :



Les chromosomes recombinés donneront des descendants soit fertiles et non brachytiques, soit semi-stériles et brachytiques (69 en tout pour les 2 classes sur un total de 682, donc une fréquence d'environ 10 pour cent). Nous voyons que cette fréquence est en fait une mesure de la distance (10.u.c.) entre le locus brachytique et le point de rupture. (Nous aurions obtenu essentiellement le même résultat si nous avions situé le locus brachytique de l'autre côté du point de rupture).

2. Une généticienne du maïs étudie la recombinaison entre deux gènes, *b* et *l*, qui sont espacés de 18 u.c. sur le bras droit du chromosome 12. Elle s'intéresse particulièrement à une lignée pure (M) isolée de la nature. Les croisements entre individus de cette lignée donnent une FR de 18 pour cent entre *b* et *l*, la même qu'entre individus de la lignée courante (P). Cependant, si l'on croise entre eux des souches de ces deux lignées, en les munissant de marqueurs appropriés (++ / ++ × *bl* / *bl*) et que l'on croise des plants de la F_1 avec une souche-test *bl* / *bl* de la lignée M, la FR tombe à 2 pour cent. On obtient la même valeur si l'on croise la F_1 avec une souche-test *bl* / *bl* de la lignée P. Formulez une hypothèse pour expliquer :

a. La FR obtenue au sein de la lignée M.

b. La FR obtenue au sein de la lignée P.

c. La FR obtenue dans le croisement test F_1 × M.

d. La FR obtenue dans le croisement test F_1 × P.

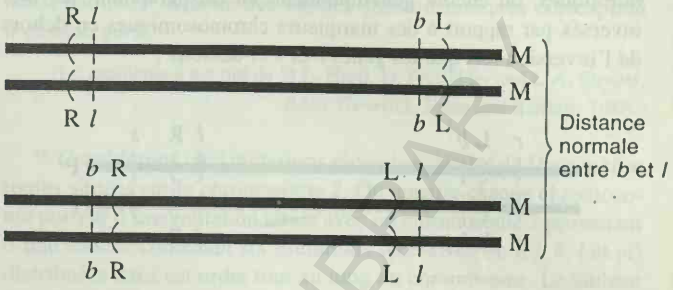
e. L'*origine* des recombinants dans chaque croisement test.

f. Comment mettriez-vous cette hypothèse à l'épreuve ?

Solution

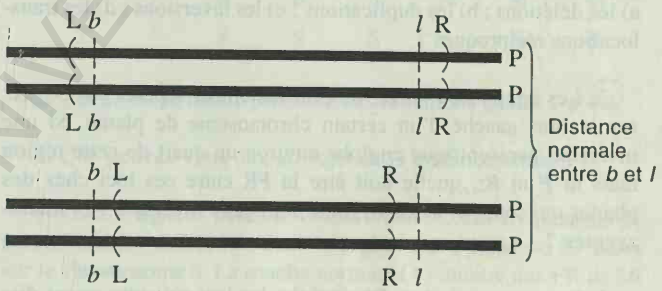
Dans ce problème, comme dans bien d'autres exemples d'analyse génétique, les données recèlent un indice important ; une fois que celui-ci est saisi, la signification des résultats expérimentaux apparaît clairement. Ici l'indice est la chute de la FR. Seul un petit nombre de mécanismes génétiques peuvent causer un tel effet. Dans ce chapitre nous en avons étudié deux : les inversions et les délétions. Dans ce cas-ci, l'hypothèse délétion est fort peu probable, et ceci pour deux raisons. Premièrement la lignée M est viable alors que de grandes délétions ne sont généralement pas viables à l'état homozygote. Deuxièmement, la FR est normale au sein de la lignée M, ce qui serait inattendu dans le cas d'une délétion. Il nous reste donc la possibilité que M contient une inversion de grande taille englobant la région *b* - *l* entière ou presque. De prime abord, nous pourrions penser qu'un des loci se trouve dans l'inversion et l'autre en dehors, mais ceci n'expliquerait pas la valeur obtenue au sein de la lignée M (voyez la réponse au point a). Traçons des schémas compatibles avec notre hypothèse en indiquant les extrémités gauche (G) et droite (D) du segment inversé dans M et la position des gènes *b* et *l*.

a.

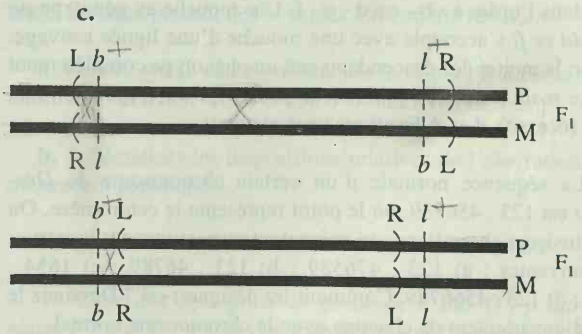


Notez que si l'un des loci se trouvait dans l'inversion et l'autre en dehors, on n'obtiendrait pas une distance génétique normale. Par exemple

b.



c.



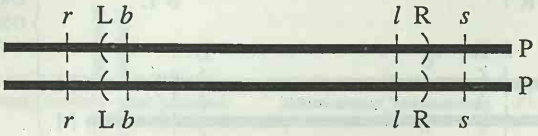
d. Même F_1 qu'en (c). La souche-test n'introduit pas de différence.

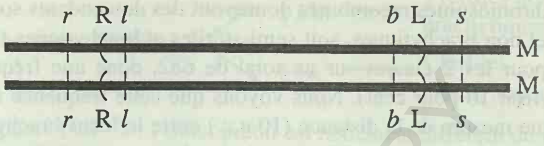
e. Deux possibilités sont à considérer. Soit les recombinants proviennent de doubles crossing-over : un entre les deux loci et un autre en dehors mais dans l'inversion (Noter que des crossing-over doubles entre les mêmes chromatides ne produisent pas de pont dicentrique). Soit ils proviennent d'un simple crossing-over dans la petite partie du segment *b* - *l* qui n'est pas comprise dans l'inversion.

f. Vous pouvez traiter la question cytologiquement en recherchant des boucles d'inversion à la méiose ou, si les chromosomes présentent des repères visibles telles que constrictions ou bandes,

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

en recherchant la marque d'une inversion dans les chromosomes mitotiques, ou encore génétiquement, en cartographiant les loci inversés par rapport à des marqueurs chromosomiques en dehors de l'inversion tels que les gènes *r* et *s* ci-dessous :





Dans la lignée normale P, *b* serait lié à *r* ; dans la lignée M, *b* serait lié à *s*.

PROBLÈMES

1. Quelles sont les caractéristiques (génétiques ou cytologiques) qui permettent d'identifier et de faire la distinction entre : a) les délétions ; b) les duplications ; c) les inversions ; d) les translocations réciproques ?

2. Les deux loci *P* et *Bz* sont normalement séparés par 36 u.c. sur le bras gauche d'un certain chromosome de plante. Si une inversion paracentrique englobe environ un quart de cette région mais ni *P* ni *Bz*, quelle doit être la FR entre ces loci chez des plantes qui sont : a) hétérozygotes pour cette inversion ? b) homozygotes ?

3. Supposez que chez *Drosophila*, les loci suivants soient disposés dans l'ordre a - b - c - d - e - f. Une mouche au génotype *aa bb cc dd ee ff* s'accouple avec une mouche d'une lignée sauvage. Environ la moitié des descendants ont un phénotype complètement sauvage mais les autres exhibent le phénotype correspondant aux allèles récessifs *d* et *e*. Expliquez ces résultats.

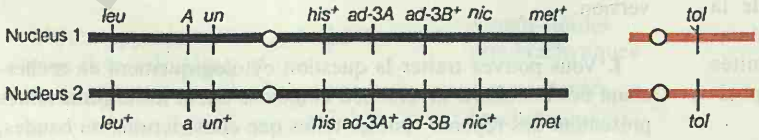
4. La séquence normale d'un certain chromosome de *Drosophila* est 123 . 456789, où le point représente le centromère. On isole plusieurs aberrations qui présentent respectivement les structures suivantes : a) 123 . 476589 ; b) 123 . 46789 ; c) 1654 . 32789 ; d) 123 . 4566789. Comment les désigne-t-on ? Dessinez le mode d'appariement de chacune avec le chromosome normal.

5. On forme un hétérocaryon de *Neurospora* en assemblant dans le même cytoplasme les noyaux possédant les génotypes suivants : *leu, his, ade, nic* et *met* sont tous des allèles récessifs provoquant des exigences nutritionnelles. *A* et *a* sont les allèles du type conjuguant (l'un des parents doit être *A* et l'autre *a* pour qu'un croisement soit possible entre eux). D'ordinaire, *A* et *a* ne peuvent être associés en un hétérocaryon mais la mutation récessive *tol* supprime cette incompatibilité et permet à l'hétérocaryon de se développer sur un milieu de croissance végétative. L'allèle *un* est récessif, empêche la souche de croître à 37°C (c'est un allèle sensible à la température) et son effet ne peut être corrigé par un apport nutritif. Cet hétérocaryon se développe bien sur milieu minimum ainsi que la plupart des cellules qui en dérivent par mitose. Cependant, quelques rares cellules montrent les traits suivants :

- Elles ne croissent pas sur milieu minimum à moins qu'on y ajoute de la leucine.
- Lorsqu'on les transfère sur un milieu de croisement, aucune autofécondation ne se produit.
- Elles ne croissent pas à 37°C même en présence de leucine.
- Si on les met en présence de cellules sauvages de type *a*, le croisement se produit ; il ne se produit pas en présence de cellules *A*.
- Du croisement avec le sauvage *a*, on peut obtenir des descendants ayant le génotype du noyau 1, mais aucun allèle du noyau 2 n'apparaît jamais dans cette descendance.

Expliquez la genèse de ces cellules bizarres dans l'hétérocaryon ainsi que la série d'observations les concernant.

6. Certaines souris, dites «valseuses» exécutent des pas bizarres, différents de la démarche normale. Cette différence est génétique et la «valse» est un caractère récessif. W.H. Gates accoupla des valseuses et des homozygotes normaux et, parmi plusieurs centaines de descendants, on ne trouva qu'une valseuse (♀), le reste étant normal. Accouplée à un valseur , elle produisit une descendance entièrement valseuse. Accouplée à un homozygote normal, elle donna une descendance entièrement normale.



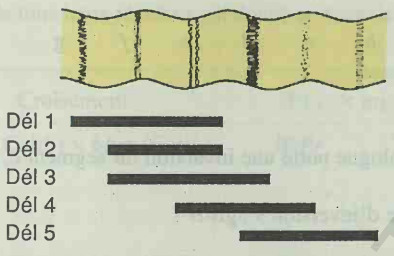
BOSTON UNIVERSITY LIBRARY

Quelques mâles et femelles de cette progéniture furent accouplés ; dans leur descendance n'apparut aucun phénotype valseur. Painter examina les chromosomes de souris valseuses issues de certains des croisements de Gates et qui donnaient une descendance semblable à celle de la valseuse insolite originale . Il trouva que ces animaux avaient 40 chromosomes tous comme les souris normales ou les valseuses habituelles. Chez les valseuses insolites, cependant, l'un des membres d'une paire de chromosomes était anormalement court. Interprétez ces observations aussi complètement que possible, sur les plans génétique et cytologique.

(Le problème 6 est tiré de A.M. Srb, R.D. Owen et R.S. Edgar, *General Genetics*, 2d ed. Copyright © 1965 par W.H. Freeman and Company.)

7. Chez *Neurospora crassa*, il est assez facile d'obtenir des mutants du gène *ad-3B* car, outre leur exigence pour l'adénine, ils ont une couleur rouge. Cent mutants *ad-3B* spontanés furent isolés à partir de cultures haploïdes. Des cellules de chacun d'entre eux furent étalées sur un milieu sans adénine, afin de tester leur capacité de réverser. Même après de nombreux étalements en présence de divers mutagènes, 13 de ces cultures ne produisirent aucun réversant. Quelle est la nature probable de ces mutants ? Expliquez l'incapacité de réverser aussi bien que la viabilité à l'état haploïde.

8. La figure ci-dessous représente six bandes d'un chromosome de glande salivaire de *Drosophila*, ainsi que les étendues respectives de cinq délétions (Dél 1 à Dél 5) :



On sait que les allèles récessifs *a*, *b*, *c*, *d*, *e* et *f* sont dans cette région mais on ignore leur ordre. Lorsqu'on construit des hétérozygotes pour ces délétions et chacun de ces allèles, on obtient les résultats suivants :

	a	*b*	*c*	*d*	*e*	*f*
Dél 1	–	–	–	+	+	+
Dél 2	–	+	–	+	+	+
Dél 3	–	+	–	+	–	+
Dél 4	+	+	–	–	–	+
Dél 5	+	+	+	–	–	–

Dans cette table un - signifie que la délétion englobe l'allèle sauvage correspondant (la délétion démasque l'allèle récessif) et un + indique la présence de cet allèle sauvage. A partir de ces données, déduisez laquelle des bandes chromosomiques correspond à chaque gène.

(Le problème 8 est tiré de D.L. Hartl, D. Freifelder and L.A. Snyder, *Basic Genetics*, Jones and Bartlett, 1988.)

9. Considérons cinq mutations récessives létales de *Drosophila*, toutes situées sur le chromosome 2. On apparie chaque chromosome porteur d'une mutation létale avec un chromosome 2 provenant d'une souche contenant six mutations récessives (*h*, *i*, *j*, *k*, *l* et *m*) distribuées dans cet ordre tout au long du chromosome. Le tableau 8-1 donne l'aspect des mouches ainsi obtenues, M signifiant mutant pour l'un ou l'autre phénotype et S sauvage.

Mutation léthale	Marqueur sur le chromosome 2					
	h	i	j	k	l	m
1	M	M	S	S	S	S
2	S	S	S	M	M	S
3	S	S	S	S	S	M
4	S	S	S	M	M	M
5	S	S	S	S	S	S

a. Quelle est la nature probable des mutations létales 1 à 4 ?

b. Que pouvez-vous dire au sujet de la mutation létale 5 ?

10. Deux lignées pures de maïs montrent des fréquences de recombinaison différentes dans la région qui s'étend de *P1* à *sm* sur le chromosome 6. La souche normale (A) montre une FR de 26 pour cent et l'anormale (B) une FR de 8 pour cent. Un croisement entre les deux produit des hybrides à fécondité réduite.

a. Statuez sur la cause possible de la faible FR dans la souche anormale : délétion ou inversion ? Donnez vos raisons.

b. Schématisez les dispositions relatives de l'aberration et des marqueurs génétiques.

c. Pourquoi les hybrides ont-ils une fécondité réduite ?

11. Chez une drosophile de génotype *P Bar Q / p Bar q*, les gènes *P / p* et *Q / q* sont des marqueurs qui flanquent la mutation Bar (ici à l'état homozygote) de très près. Dans un croisement test conçu pour détecter les produits méiotiques issus d'une telle mouche, on obtient à basse fréquence des descendants présentant soit des yeux normaux, soit le phénotype double bar, chez lesquels on retrouve les marqueurs flanquants dans les combinaisons *Pq* ou *pQ*. Expliquez les points suivants par des diagrammes :

a. L'origine des rares individus de type normal ou double bar.

b. L'association de ces caractères avec les marqueurs flanquants.

12. Considérez une lignée pure de *Drosophila* portant une duplication du fragment du chromosome X qui contient le gène «œil vermillon». La constitution de la lignée est la suivante

BOUIASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\frac{v^+ \quad v^-}{v^+ \quad v^-}$$

Elle possède des yeux de couleur normale (sauvage). Croisons des femelles de cette lignée avec des mâles vermillon ne portant pas la duplication :

$$X\ \frac{v^+ \quad v^-}{v^+ \quad v^-} \times X\ \frac{v^-}{\quad} \quad Y\ —$$

Les descendants mâles possèdent tous des yeux de couleur normale et les femelles toutes des yeux vermillon. Expliquez en quoi ces résultats sont surprenants du point de vue de la théorie de la dominance. Expliquez les phénotypes des parents ainsi que ceux de leurs descendants, mâles et femelles.

13. On trouve une drosophile hétérozygote pour une inversion paracentrique. Il est cependant impossible d'obtenir des mouches homozygotes pour cette inversion, même après de multiples croisements. Quelle est l'explication la plus probable de ces résultats ?

14. Chez *Neurospora,* le locus *un3* est tout juste à gauche du centromère sur le chromosome 1 et ségrège toujours à la première division méiotique. Le locus *ade3* est à *10 u.c.* sur la droite du même centromère.

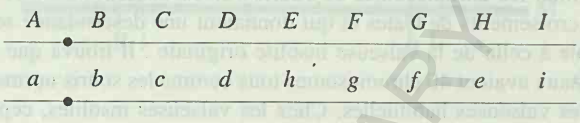
a. Supposant qu'il se produit tout au plus un crossing-over dans la région *un3-ad3,* quels types d'asques prédisez-vous — et à quelle fréquence — dans un croisement entre *un3, ad3* et le sauvage ?

b. La plupart du temps, ces croisements donnent les résultats prévus mais dans le cas d'un croisement entre la souche standard *un3, ad3* et une souche sauvage isolée d'un champ de cannes à sucre à Hawaï, les résultats suivant furent obtenus :

● *un3, ad3*	● *un3, ad3*
● *un3, ad3*	● *un3, ad3*
● *un3, ad3*	○ }
● *un3, ad3*	○ } avortent
● + +	○ }
● + +	○ }
● + +	● + +
● + +	● + +
(et sa version réciproque) 80 %	(et d'autres ordres de paires de spores) 20 %

Formulez une hypothèse pour expliquer ces résultats et dites comment vous la mettriez à l'épreuve.

15. Un pétunia est hétérozygote pour les homologues autosomiques ci-dessous :



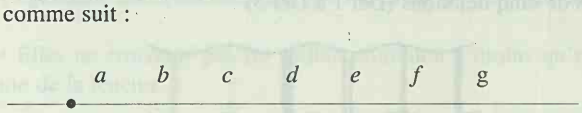
a. Représentez l'appariement qui se forme à la métaphase I, marquez toutes les parties du schéma et numérotez les chromatides du haut en bas.

b. Deux crossing-over impliquant trois chromatides se produisent, l'un entre les loci C et D des chromatides 1 et 3, l'autre entre les loci G et H des chromatides 2 et 3. Représentez les produits de ces recombinaisons tels qu'ils se présenteraient à l'anaphase I et marquez votre schéma.

c. Représentez la disposition des chromosomes à l'anaphase II suite aux crossing-over décrits au point b.

d. Donnez les génotypes des gamètes issus de cette méiose et susceptibles de former des descendants viables. Considérez que tous les gamètes sont fécondés par du pollen où l'ordre des gènes est A B C D E F G H I.

16. Un hétérozygote pour une inversion possède un chromosome comme suit :



tandis que l'homologue porte une inversion du segment *c, d, e, f.*

a. De quel type d'inversion s'agit-il ?

b. Représentez l'appariement de ces chromosomes.

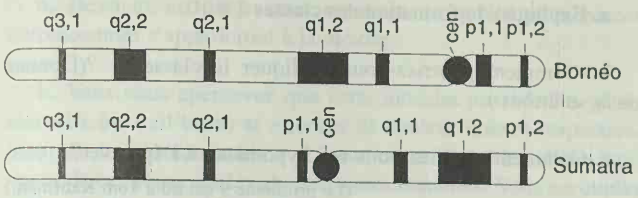
c. Si un double cross-over se produit entre les 4 chromatides dans les régions *c-d* et *e-f,* quels seront les produits de la méiose ?

d. Qu'en sera-t'il pour un double crossing-over entre 3 des chromatides dans les mêmes régions ?

e. Certains des produits de la méiose auront-ils un karyotype normal ? Expliquez.

17. Les orang-outans sont une espèce menacée dans leur milieu naturel (les îles de Bornéo et de Sumatra), de sorte que l'on tente de les faire se reproduire en captivité dans divers zoos. En parallèle on examine ces animaux sur le plan cytogénétique. Ces recherches ont montré que tous les orang-outans de Bornéo portent une forme du chromosome 2 (voyez le schéma suivant) et que tous ceux de Sumatra en portent une autre. Avant que ces différences ne fussent mises en évidence, des croisements avaient été obtenus entre animaux d'îles différentes et 14 descendants sont à présent élevés en captivité.

BUJIASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



a. Dans quels termes décrivez-vous les différences entre ces deux types de chromosomes ?

b. Représentez l'appariement des chromosomes d'un hybride à la première prophase méiotique. N'oubliez aucun des marqueurs indiqués dans la figure.

c. Dans 30 pourcent des méioses il se produira un crossing-over dans la région entre les bandes p.1.1 et 9.1.2. Représentez les chromosomes 2 dans les gamètes qui seront le produit d'une méiose avec un crossing-over dans la bande 9.1.1.

d. Quelle fraction des gamètes produits par un orang-outan hybride enjendrera-t'elle une descendance viable pour autant que seuls ces chromosomes diffèrent entre les parents ?

18. Deux groupes de généticiens, l'un en Californie, l'autre au Chili, entreprennent de construire la carte de liaison d'une espèce de mouche. Ils trouvent chacun que les loci pour la couleur du corps (*B* = noir, *b* = gris) et la forme des yeux (*R* = rond, *r* = étoilé) sont à 28 m.u. l'un de l'autre. Ils s'envoient réciproquement leurs souches ; le résumé de tous leurs résultats est donné ci-dessous.

Croisement	F1	Descendance de F1 × un *bbrr* quelconque	
BBRR (Calif.) × *bbrr* (Calif.)	*BbRr*	*BbRr*	36%
		bbrr	36
		Bbrr	14
		bbRr	14
BBRR (Chili) × *bbrr* (Chili)	*BbRr*	*BbRr*	36
		bbrr	36
		Bbrr	14
		bbRr	14
BBRR (Calif.) × *bbrr* (Chili) ou *bbrr* (Calif.) × *BBRR* (Chili)	*BbRr*	*BbRr*	48
		bbrr	48
		Bbrr	2
		bbRr	2

a. Formulez une hypothèse pour expliquer les trois séries de résultats.

b. Comment se présentera la méiose chez la F1 d'un croisement entre les lignées californiennes et chiliennes ? Faites un schéma faisant apparaître les points cruciaux.

19. On trouve *Drosophila* partout dans le monde. Les résultats d'une analyse cartographique du chromosome 2 mettant en jeu des lignées pures originaires de la vallée d'Okanagan (Canada) furent comparés à ceux d'une analyse similaire effectuée sur des mouches espagnoles. Les fréquences de recombinaison suivantes (en pour cent) furent obtenues pour les six loci A - F : (I* représente un assortiment indépendant soit une RF de 50) :

a. Analysez ces données sous l'angle de la disposition relative des marqueurs dans les deux cas et trouvez une explication pour toute(s) différence(s) éventuelle(s). Dressez une carte à partir de chacun des deux ensembles de données en indiquant les distances.

Okanagan

	A	*B*	*C*	*D*	*E*	*F*
A	0	12	14	23	3	29
B		0	2	35	15	17
C			0	37	17	15
D				0	20	I*
E					0	32
F						0

Espagne

	A	*B*	*C*	*D*	*E*	*F*
A	0	12	7	30	3	22
B		0	19	18	15	34
C			0	37	4	15
D				0	33	I*
E					0	19
F						0

I* = assortiment indépendant ; FR = 50.

b. Dites à quelles fréquences de recombinaison on pourrait s'attendre dans les cinq régions définies par ces marqueurs chez des hybrides entre une souche Okanagan et une souche espagnole.

20. Dans un croisement avec une souche-test, une plante de maïs aberrante donne les résultats suivants :

	Intervalle				
	d-f	*f-b*	*b-x*	*x-y*	*y-p*
RF obtenues chez une plante standard	5	18	23	12	6
RF obtenues chez la plante aberrante	5	2	2	0	6

L'ordre des loci est centromère-*d-f-b-x-y-p*. La plante aberrante est saine, mais produit beaucoup moins d'ovules et de pollen que la plante de référence.

a. Proposez une hypothèse pour expliquer le caractère anormal de la recombinaison et de la fertilité chez la plante aberrante.

b. Montrez par un diagramme comment votre hypothèse explique l'origine des recombinants.

BCU ASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

21. Chez le maïs les loci suivants se trouvent sur un bras du chromosome 9, dans l'ordre indiqué (les distances qui les séparent sont exprimées en unités cartographiques) :

e —— *bz* —— *wx* —— *sh* —— *d* —— centromère
12 8 10 20 10

C donne un aleurone coloré ; *c* un aleurone blanc
Bz donne des feuilles vertes ; *bz* des feuilles bronzées
Wx donne des graines amidonnées ; *wx* des graines cireuses
Sh donne des graines pleines ; *sh* des graines ratatinées
D donne des plantes de grande taille ; *d* des naines

Une plante homozygote pour les cinq allèles récessifs est croisée avec une plante mexicaine homozygote pour les cinq allèles dominants. Tous les individus de la F_1 expriment l'ensemble des allèles dominants ; lorsqu'ils sont croisés en retour avec le parent récessif, ils produisent la descendance suivante :

colorés, verts, amidonnés, pleins, grands	360
blancs, bronzés, cireux, ratatinés, nains	355
colorés, bronzés, cireux, ratatinés, nains	40
blancs, verts, amidonnés, pleins, grands	46
colorés, verts, amidonnés, pleins, nains	85
blancs, bronzés, cireux, ratatinés, grands	84
colorés, bronzés, cireux, ratatinés, grands	8
blancs, verts, amidonnés, pleins, nains	9
colorés, verts, cireux, pleins, grands	7
blancs, bronzés, amidonnés, ratatinés, nains	6

Formulez une hypothèse pour expliquer ces résultats, en adoptant la présentation suivante :

a. énoncez l'hypothèse en l'illustrant d'un schéma

b. expliquez pourquoi il y a 10 classes

c. expliquez l'origine de chaque classe ainsi que sa fréquence

d. proposez au moins une expérience qui permette de tester l'hypothèse.

22. Une généticienne de *Drosophila* possède une lignée pure sauvage. Elle croise cette souche avec une lignée porteuse d'un chromosome X pourvu des allèles récessifs *y* (jaune), *cv* (sans nervures transversales), *v* (vermillon), *f* (fourchu), et *car* (incarnat), également distribués d'un bout à l'autre du chromosome X. Elle rassemble les femelles hétérozygotes de la F_1 et les apparie avec des mâles *y cv v f B car* (*B* = Bar). Elle obtient les classes suivantes parmi la descendance mâle :

1. *y cv v f car*
2. + + + + +
3. *y* + + + *car*
4. + *cv v f* +
5. *y cv* + *f car*
6. + + *v* + +
7. *y cv* + + *car*
8. + + *v f* +
9. *y* + + *f car*
10. + *cv v* + +
11. *y cv v f B car*

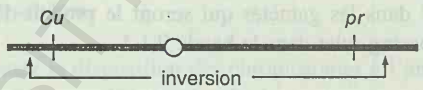
a. Expliquez la formation des classes 1 à 10.

b. Comment pourriez-vous expliquer la classe 11 ?(Donnez deux solutions.)

c. Comment mettriez-vous vos hypothèses à l'épreuve ?

(Le problème 9 est dû à Tom Kaufman.)

***23.** Supposez que vous disposiez d'une lignée de *Drosophila* dans laquelle vous puissiez puiser à volonté des mâles et des femelles vierges. La lignée est homozygote pour un chromosome 2 porteur d'une inversion (pour empêcher le crossing-over), d'un gène dominant (*Cu*, pour ailes recourbées) et d'un gène récessif (*pr*, pourpre, pour yeux sombres). On peut représenter le chromosome comme suit



Vous avez irradié le sperme dans un mâle sauvage et vous désirez déterminer quelles mutations à la fois récessives et létales ont été induites ainsi dans le chromosome 2. Comment vous y prendriez-vous ? (SUGGESTION : Rappelez-vous que chaque spermatozoïde porte un exemplaire *différent* du chromosome 2 irradié). Mentionnez les types et les nombres de mouches utilisées dans chaque croisement.

24. Prédisez les configurations chromosomiques qui se formeront à l'anaphase méiotique 1 dans un hétérozygote pour une translocation réciproque subissant. a) une ségrégation alternée ; b) une ségrégation adjacente de type 1.

25. Chez *Neurospora,* les gènes *a* et *b* se trouvent sur des chromosomes différents. Dans un croisement entre une souche standard *a b* avec une souche sauvage provenant de la nature, la descendance se présente comme suit : *a b,* 45 pour cent ; ++, 45 pour cent ; *a* +, 5 pour cent ; + *b*, 5 pour cent. Interprétez ces résultats et expliquez l'origine de tous les types de descendants à la lumière de votre hypothèse.

26. *Cy* (ailes recourbées) est une mutation dominante du second chromosome de *Drosophila.* Nous exposons un mâle *Cy* / + aux rayons X et le croisons avec des femelles + / +. Nous apparions alors les fils *Cy* / + avec des femelles + / + couple par couple. De l'un de ces croisements les descendants sont les suivants :

Mâles recourbés	146
Mâles sauvages	0
Femelles recourbées	0
Femelles sauvages	163

Quelle serait l'anomalie chromosomique qui fournirait la meilleure explication de ces résultats ? Pour répondre, utilisez les diagrammes chromosomiques de toutes les souches mentionnées dans l'énoncé de la question (SUGGESTION : Rappelez-vous qu'il ne se produit pas de crossing-over chez les mâles de *Drosophila.*)

27. Vous découvrez une drosophile mâle hétérozygote pour une translocation réciproque entre le deuxième et le troisième chromosome, chacune des ruptures s'étant produite près du centromère (lui-même situé vers le centre de ces chromosomes).

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a. Dessinez un diagramme montrant de quelle manière ces chromosomes s'apparieront à la méiose.

b. Vous vous apercevez que cette mouche possède les gènes récessifs *bw* (œil brun) et *e* (corps de couleur ébène) respectivement sur les chromosomes 2 et 3 non remaniés, et les allèles sauvages de ces gènes sur les chromosomes remaniés. Vous accouplez cette mouche avec une femelle qui possède des chromosomes normaux et est homozygote pour *bw* et *e*. A quels types de descendants vous attendez-vous et dans quelles proportions ? (SUGGESTION : Rappelez-vous que les zygotes pourvus d'un bras de chromosome supplémentaire ou chez qui manque un chromosome ne sont pas viables. Le crossing-over ne se produit pas dans les drosophiles mâles.)

28. Une translocation *insertionnelle* s'est produite par l'insertion d'un fragment chromosomique central dans la région médiane d'un autre chromosome (non homologue). Donc

devient

A quels appariements méiotiques les génomes hétérozygotes pour de telles translocations vont-ils donner lieu ? En supposant que de tels hétérozygotes se produisent chez *Neurospora,* quels profils de spores abortives obtiendriez-vous dans les octades et dans quelles proportions relatives ? (SUGGESTION : Rappelez-vous que les duplications sont viables et produisent des spores noires, mais que les déficiences (ou délétions) produisent des spores claires.)

29. Chez le maïs les gènes de la longueur du panicule (allèles *T* et *t*) et de la résistance à la rouille(allèles *R* et *r*) sont sur des chromosomes différents. Lors d'une série de croisements de routine, un éleveur constata qu'une plante *TtRr* donnait des résultats inattendus après un croisement test avec le pollen du parent double récessif *ttrr*. Les résultats étaient :

descendance :	*TtRr*	98
	ttrr	104
	Ttrr	3
	ttRr	5

épis de maïs : seulement la moité du nombre normal de graines.

a. En quoi ces résultats sont-ils inattendus ?

b. Formulez une hypothèse concise pour expliquer les résultats.

c. Indiquez les génotypes des parents et de la descendance.

d. Tracez un diagramme montrant la disposition des allèles sur les chromosomes.

e. Expliquez l'origine des deux classes de descendants comportant respectivement 3 et 5 individus.

Décomposons le problème

a. Que signifient les expressions «gènes de la longueur du panicule» et «de la résistance à la rouille» ?

b. Importe-t'il que la signification précise des symboles alléliques *T,t,R* et *r* ne soit pas donnée ? Pourquoi ?

c. Quelle est la relation entre les termes *gène* et *allèle*, tels qu'utilisés ici, et les concepts de locus et de paire de gène ? (un diagramme conceptuel serait une manière de répondre).

d. Quel genre de résultats préalables donneraient aux généticiens l'idée que les deux gènes sont sur des chromosomes différents ?

e. Que croyez-vous que sont des croisements «de routine» pour des éleveurs de maïs ?

f. Quel terme utiliser pour décrire les génotypes de genre *TtRr* ?

g. Que signifie «croisement avec le pollen» ?

h. Que sont les «croisements tests» et pourquoi les généticiens les trouvent-ils si utiles ?

i. Quels types de descendants et de fréquences l'éleveur s'attendait-il à obtenir du croisement test ?

j. De quelle manière la descendance obtenue différait-elle des résultats attendus ?

k. Qu'indique l'égalité approximative des deux premières classes de descendants ?

l. Même question pour les deux dernières.

m. Qu'étaient les gamètes de la plante insolite et quelles étaient leurs proportions relatives ?

n. Quels gamètes étaient-ils majoritaires ?

o. Minoritaires ?

p. Quels descendants paraissent-ils être des recombinants ?

q. Quelles combinaisons d'allèles apparaissent-elles liées d'une manière ou d'une autre ?

r. Comment peut-on observer une liaison entre marqueurs supposés se trouver sur des chromosomes différents ?

s. Que nous indiquent ces classes majoritaires ou minoritaires au sujet des génotypes des parents de la plante insolite ?

t. Qu'est-ce qu'un épi de maïs ?

u. A quoi ressemble un épi normal (dessinez-en un et marquez le) ?

BOJIASI/CEU RAU UNIVERSITY LIBRARY

v. A quoi ressemblent les épis de ce croisement (faites un dessin) ?

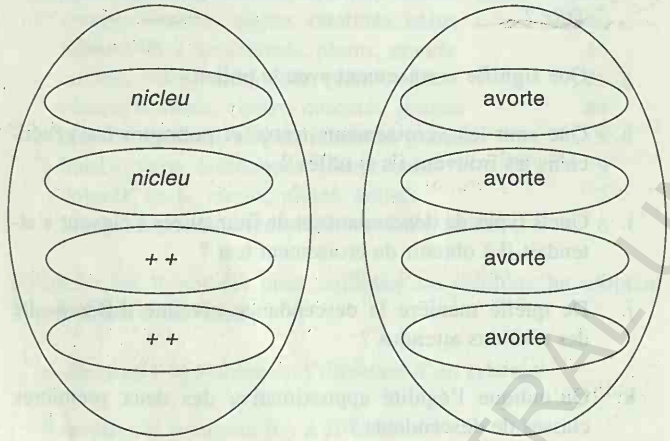
w. Qu'est-ce exactement qu'un grain de maïs ?

x. Quel effet pourrait réduire de moitié le nombre de grains ?

y. La moitié des grains n'a-t'elle pas survécu ? Si c'est le cas, était-ce le parent mâle ou femelle qui en était la cause ?

A présent essayez de résoudre le problème.

30. Le champignon ascomycète *Schizosaccharomyces pombe* produit des tétrades dont les spores ne sont pas ordonnées comme chez *Neurospora*. On a croisé une souche de laboratoire de génotype *nic-2, leu-3* et une souche sauvage isolée à partir de raisins. Des études antérieures avaient montré que *nic-2* était sur le chromosome 1 et *leu-3* sur le chromosome 4. Ce fut dès lors une surprise de n'observer que deux types de tétrades à fréquences égales, sur les 100 analysées.



a. A quel résultat s'attendait-on ?

b. Expliquez les résultats, indiquant les génotypes des parents et celui des ascospores obtenues.

(Note : chez ce champignon, les génomes porteurs de délétions ou de duplications-délétions avortent tous à la méiose).

31. Chez le maïs, le locus *g* (+ = pourpre, *g* =vert) est sur le chromosome 2 et le locus *w* (+ = amidonneux, *w* = cireux) sur le chromosome 9. Un sauvage homozygote donnait des résultats inattendus dans des croisements de routine où ces marqueurs étaient mis en jeu. Croisé avec vert, cireux, il fournissait une F1 apparemment sauvage mais environ la moitié des ovules et du pollen avortait. La F1 fut soumise à un croisement test et dans 50 descendants on en obtint 28 verts, cireux produisant des gamètes normaux et 22 sauvages dont 50 pourcent des gamètes avortait.

a. Proposez une explication pour ces résultats en traçant des diagrammes des parents, de la F1 et de la descendance du croisement test.

b. Si l'on autoféconDait la F1 quels phénotypes obtiendrait-on et dans quelles proportions ?

32. La couleur jaune du corps de *Drosophila* est due à un allèle mutant *e* d'un gène situé à l'une des extrémités du chromosome X (l'allèle sauvage donne une couleur grise). Un mâle fut irradié aux rayons X, puis croisé avec une femelle jaune. La plupart des descendants mâles étaient jaunes comme ou s'y attendait, mais l'examen de plusieurs milliers de mouche révéla deux mâles gris (donc phénotypiquement sauvages). On les croisa avec des femelles jaunes, ce qui donna les résultats suivants :

	Descendance
mâle gris 1 × femelle jaune	femelles toutes jaunes mâles tous gris
mâle gris 2 × femelle jaune	$\frac{1}{2}$ des femelles jaunes $\frac{1}{2}$ des femelles grises $\frac{1}{2}$ des mâles jaunes $\frac{1}{2}$ des mâles gris

a. Expliquez l'origine et le croisement avec le mâle gris 1.

b. Faites de même pour le mâle gris 2.

33. Chez *Neurospora,* les marqueurs *ad-3* et *pan-2* sont des mutations auxotrophes respectivement situées sur les chromosomes 1 et 6. On isole au laboratoire une souche *ad-3* au comportement inhabituel, comme en témoignent les résultats suivants :

	Aspect des ascospores	FR entre *ad-3* et *pan-2*
1. *ad-3* normal × *pan-2* normal	toutes noires	50%
2. *ad-3* anormal × *pan-2* normal	environ la $\frac{1}{2}$ noire et l'autre claire (non viable)	1%

3. Parmi les spores noires du croisement 2, environ la moitié sont complètement normales et les autres se comportent comme la nouvelle souche *ad-3* anormale.

Expliquez ces trois résultats en vous servant de diagrammes clairement annotés (NOTE : Chez *Neurospora,* les ascospores porteuses de matériel génétique supplémentaire survivent et présentent la couleur noire normale, alors que les ascospores affectées d'une délétion sont blanches et non viables.)

34. Des plants de maïs porteurs de l'allèle *P* produisent des feuilles pourpres et des plants homozygotes pour *p* des feuilles vertes. Le locus *P* est à 20 u.c. du centromère sur le long bras du chromosome 9. Un plant homozygote *pp* est croisé avec un plant

BOSTON UNIVERSITY CENTRAL LIBRARY

PP homozygote pour une translocation réciproque dont l'un des points de rupture est à 30 u.c. du centromère sur le long bras du chromosome 9. La F_1 obtenue, on la croise en retour avec le parent *pp*. Prédisez dans quelles proportions les descendants seront respectivement

a. verts, semi-stériles

b. verts, normalement stériles

c. pourpres, semi-stériles

d. pourpres, normalement fertiles

e. Si on croise entre eux des plants de la F_1, quelle proportions des descendants sera-t-elle verte et normalement fertile ?

35. Le maïs possède un locus *p* sur le chromosome 1 et un locus *s* sur le chromosome 5.

P donne des feuilles vert foncé, *p* des feuilles vert pâle

S donne des épis de grandes dimensions et *s* des épis de taille réduite

Un plant particulier de génotype *Pp Ss* a le phénotype attendu (vert foncé, grands épis), mais donne des résultats inattendus dans les croisements ci-dessous :

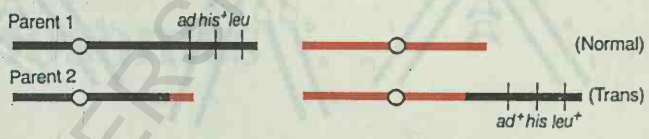
- Si on le laisse s'autoféconder, la fertilité est normale mais la fréquence du type *pp ss* est $\frac{1}{4}$ (et non $\frac{1}{16}$, comme on s'y attendrait).
- Lorsqu'on le croise avec une souche-test normale *pp ss*, la F_1 est à moitié *Pp Ss* et à moitié *pp ss* ; la fertilité est normale.
- Si l'on croise un plant *Pp Ss* de la F_1 avec la souche-test *pp ss*, il s'avère semi-stérile mais, à nouveau, la descendance est $\frac{1}{2}$ *Pp Ss* et $\frac{1}{2}$ *pp ss*.

Expliquez ces résultats en donnant le génotype complet du plant d'origine, de la souche-test et des plants de la F_1. Comment mettriez-vous votre hypothèse à l'épreuve ?

36. On croise une plante de maïs *pr / pr* possédant des chromosomes normaux avec une plante *PrPr* homozygote pour une translocation réciproque entre les chromosomes 2 et 5. La F_1 est semi-stérile et phénotypiquement Pr (concerne la couleur du grain). Un croisement en retour avec le parent possédant des chromosomes normaux donne 764 Pr semi-stériles ; 145 pr semi-stériles ; 186 Pr normaux ; et 727 pr normaux. Quelle est la distance entre le locus *Pr* et le point de rupture de la translocation ?

37. Vous obtenez, chez *Neurospora*, une translocation réciproque du type suivant :

Vous procédez alors au croisement ci-dessous :



En supposant que le petit fragment coloré impliqué dans la translocation ne porte aucun gène essentiel, comment pourriez-vous sélectionner des produits méiotiques portant une duplication de l'autre segment (noir) déplacé par la translocation ?

38. Un rat mâle phénotypiquement normal présente des anomalies de reproduction par rapport aux mâles ordinaires. La situation est résumée dans le tableau 8-2. Expliquez ces anomalies en termes génétiques et imaginez une façon de tester votre hypothèse.

39. Au cours de la formation des asques chez *Neurospora*, les ascospores porteuses d'une délétion avortent et prennent une teinte blanche tandis que celles qui sont porteuses d'une duplication survivent et ont une teinte sombre. Quels types et quelles proportions relatives d'octades observeriez-vous dans des croisements entre une souche normale de *Neurospora* et une souche porteuse.

Tableau 8-2.

	Embryon (nombre moyen)			
Croisement	Implantés dans la paroi utérine	Dégénèrent après implantation	Normal	Dégénération (%)
Exceptionnel ♂ × normal ♀	8,7	5,0	3,7	57,5
normal ♂ × normal ♀	9,5	0,6	8,9	6,5

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a. d'une translocation réciproque

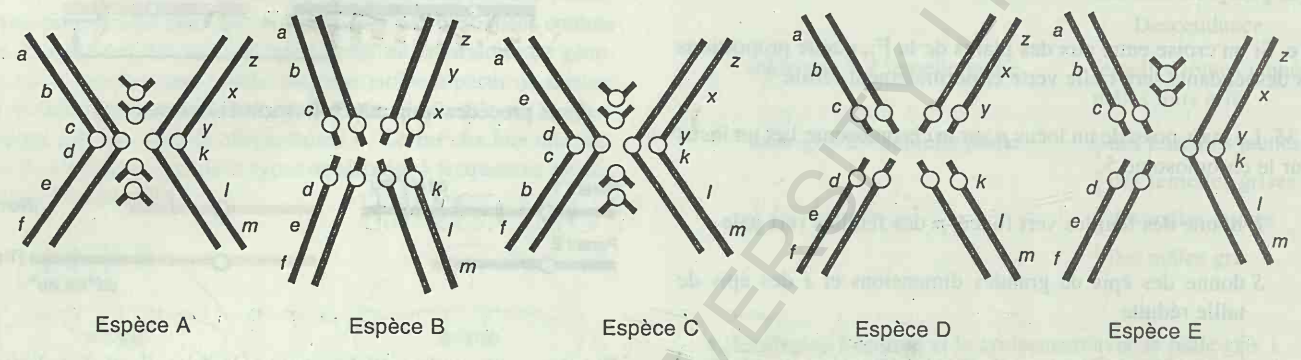
b. d'une inversion péricentrique

c. d'une inversion paracentrique

N'oubliez pas de prendre l'effet d'éventuels crossing-over en considération.

40. Vous étudiez la cytogénétique de cinq espèces de drosophiles très voisines. La figure ci-dessus donne l'ordre des gènes (les lettres indiquent des gènes identiques dans les cinq espèces) et les paires de chromosomes que l'on trouve dans chaque espèce. Montrez comment ces espèces ont dérivé l'une de l'autre, en décrivant les changements survenus à chaque étape (NOTE : Ne manquez pas de comparer avec attention les dispositions relatives des gènes.)

41. Expliquez l'origine du rapport $\frac{10}{16}$ à la p. 230.

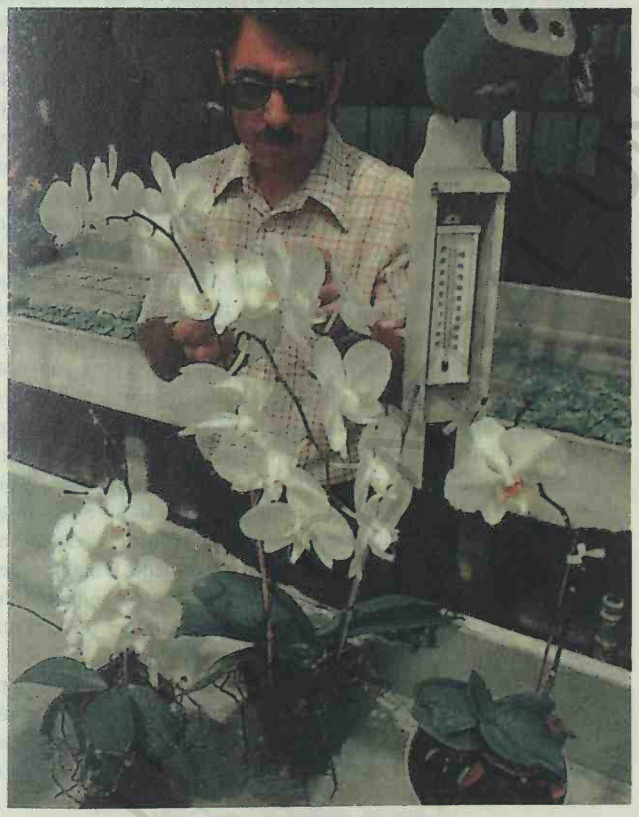


BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

9

Les mutations chromosomiques II : modifications du nombre de chromosomes



Généticien examinant une orchidée à garnitures chromosomiques multiples (un polyploïde). Comparez les dimensions du polyploïde à celles de ses parents diploïdes présentés à l'avant-plan (Runk/Schoenberger/Grant Heilman).

CONCEPTS-CLÉS

- Les organismes à jeux multiples de chromosomes (polyploïdes) sont généralement de taille plus grande que la normale, mais des anomalies d'appariement à la méiose peuvent provoquer leur stérilité.
- Chez les polyploïdes à nombre pair de jeux de chromosomes, la fertilité est généralement la règle. Dans ce cas, les rapports de ségrégation observés pour un locus déterminé diffèrent de ceux observés chez les diploïdes.
- Un croisement entre deux espèces différentes suivi du doublement du nombre chromosomique chez l'hybride aboutit à un type particulier de polyploïde interspécifique fertile.
- Des variants ayant gagné ou perdu un seul chromosome se produisent généralement par non-disjonction (ségrégation chromosomique anormale à la méiose ou à la mitose).
- De tels variants tendent à être stériles et présentent des anomalies liées au déséquilibre génique.
- Ces variants, s'ils sont fertiles, se caractérisent par des rapports anormaux de ségrégation des gènes appartenant au chromosome mal représenté.

BU UNIVERSITY LIBRARY

Le deuxième grand type de mutation chromosomique a trait au changement du nombre de chromosomes. Ce sujet pourrait à première vue, apparaître assez ésotérique et ne concerner que les généticiens. Cependant, il y a peu de domaines de la génétique qui aient une importance aussi directe pour l'homme. Les changements du nombre de chromosomes se produisent spontanément dans les cellules et ce processus s'est déroulé depuis que la vie est apparue sur notre planète. Ces changements du nombre de chromosomes ont été un des instruments de l'évolution des génomes. Pour trouver des exemples de telles modifications, nous n'avons qu'à regarder les aliments que nous utilisons journellement puisque l'origine de nombreuses plantes (et de certains animaux) réside dans un changement spontané du nombre de chromosomes au cours de l'évolution de ces espèces. De nos jours, les sélectionneurs reproduisent ces processus en manipulant le nombre des chromosomes pour améliorer la productivité ou une autre propriété bénéfique de l'organisme. Mais peut-être l'impact principal de ce phénomène pour l'espèce humaine réside-t-il dans la proportion importante de maladies génétiques dues à des variations anormales du nombre de chromosomes.

Dans ce chapitre, nous envisageons les processus conduisant à de nouveaux nombres de chromosomes, les tests permettant de les diagnostiquer et les propriétés des cellules et des individus porteurs d'une garniture chromosomique anormale. Comme dans tout domaine de la cytogénétique, les techniques utilisées associent la génétique à la microscopie. Les changements du nombre de chromosomes sont généralement classés en deux catégories, ceux modifiant l'ensemble de la garniture chromosomique et ceux n'impliquant qu'un changement partiel de celle-ci. Ces deux catégories sont traitées en détails dans les deux sections suivantes.

Euploïdie anormale

Le nombre de chromosomes d'une garniture chromosomique de base est appelé **nombre monoploïde** (x). Des organismes comportant des multiples du nombre monoploïde sont dits **euploïdes**. Nous avons décrit dans des chapitres précédents que les organismes eucaryotes comportent soit une garniture chromosomique unique (organismes haploïdes) ou deux garnitures chromosomiques (organismes diploïdes). Dans ces deux cas, on parlera d'euploïdie normale. Les types euploïdes comportant un nombre de garnitures chromosomiques supérieur à deux sont dits **polyploïdes** et sont dénommés respectivement **triploïdes** (3X), **tétraploïdes** (4X), **pentaploïdes** (5X), **hexaploïdes** (6X) et ainsi de suite. Dans la nature, les polyploïdes sont le résultat de mutations chromosomiques spontanées et, en tant que tel, doivent être considérés comme des anomalies se différenciant du type de départ. Cependant, de nombreuses espèces de plantes et d'animaux sont issues du phénomène de polyploïdie et donc l'évolution peut tirer profit de cette polyploïdie lorsqu'elle se produit. Il est important de souligner que des organismes ne présentant qu'une seule garniture chromosomique apparaissent parfois comme des variants de diploïdes : de tels variants sont dits monoploïdes (1x). Chez certaines espèces les phases monoploïdes font partie intégrante du cycle normal de vie, mais d'autres monoploïdes peuvent être considérées comme des anomalies spontanées. Le nombre haploïde (n), que nous avons déjà souvent utilisé, se rapporte exclusivement au nombre de chromosomes des gamètes. Chez la plupart des animaux et des plantes, le nombre haploïde est le même que le nombre monoploïde. Il en résulte que n ou x (ou $2n$ ou $2x$) peuvent être utilisés indifféremment. Cependant, chez certaines plantes comme le froment, n diffère de x. Le froment a 42 chromosomes, mais une étude révèle en fait que c'est un hexaploïde, comportant six jeux de sept chromosomes très similaires si pas identiques. Donc, $6x = 42$ et $x = 7$. Cependant les gamètes du froment contiennent 21 chromosomes, de telle sorte que $2n = 42$ et $n = 21$.

Monoploïdes

Les abeilles, guêpes et fourmis mâles sont monoploïdes. Au cours du cycle de vie de ces insectes, les mâles se développent parthénogénétiquement - c'est-à-dire à partir d'oeufs non-fertilisés. Chez la plupart des espèces cependant, les individus monoploïdes sont anormaux et n'apparaissent que rarement dans des populations naturelles. Tout au long de ce chapitre, nous nous intéresserons souvent à des individus à constitution chromosomique anormale parce que cette approche nous sera utile pour l'analyse génétique.

Dans les cellules germinales d'un monoploïde, la méiose ne se déroule pas normalement puisque les chromosomes ne trouvent pas de partenaires avec qui s'apparier et les monoploïdes sont donc typiquement stériles. (Cependant, la méiose peut être contournée chez certains animaux monoploïdes, comme les abeilles, guêpes et fourmis mâles, qui produisent des gamètes essentiellement par division mitotique). Si la méiose a lieu, les chromosomes individuels ségrègent au hasard et la probabilité qu'ils se dirigent tous à l'un des pôles est de $(\frac{1}{2})^{x-1}$, où x est le nombre de chromosomes. Ceci déterminera la fréquence de gamètes viables (comportant l'ensemble de la garniture), à coup sûr un nombre extrêmement petit si x est élevé.

Les monoploïdes jouent un rôle important dans l'amélioration végétale. L'état diploïde constitue un handicap pour l'induction et la sélection de nouvelles mutations favorables et de nouvelles associations de gènes. De nouvelles mutations récessives doivent être rendues homozygotes pour pouvoir s'exprimer ; des associations de gènes bénéfiques chez des hétérozygotes peuvent être rompues par la méiose. Les monoploïdes fournissent le moyen de contourner ces problèmes. Chez certaines plantes, des monoploïdes peuvent être obtenus artificiellement à partir des microspores produites par méiose au sein des anthères. Au lieu de devenir un grain de pollen, une cellule peut être induite par un traitement au froid à se développer en un **embryoïde**, c'est-à-dire une petite masse de cellules se divisant activement. L'embryoïde peut être cultivé sur agar et donner lieu à une plantule monoploïde qui, à son tour, peut être transplantée et se développer jusqu'à maturité. (figure 9-1).

Les monoploïdes végétaux peuvent être exploités de différentes manières. Tout d'abord, ils peuvent être examinés pour y déceler des caractères ou des combinaisons de gènes favorables, pouvant résulter de l'hétérozygocité déjà présente chez le parent ou qui y ont été induits par des mutagènes. Le monoploïde peut alors subir un doublement du nombre de chromosomes pour donner lieu à un diploïde complètement homozygote capable de produire des graines par méiose. Comment ceci se réalise-t-il pratiquement ? Tout simplement en traitant les tissus méristématiques à la **colchicine**. La colchicine — un alcaloïde extrait du colchique — inhibe la formation du fuseau mitotique et provoque la production de cellules à deux garnitures chromosomiques (figure 9-2). Ces cellules peuvent ensuite proliférer pour former un secteur de tissus diploïdes que l'on peut identifier cytologiquement.

Une autre façon de tirer profit des monoploïdes est de les soumettre, comme une population d'organismes haploïdes, à un trai-

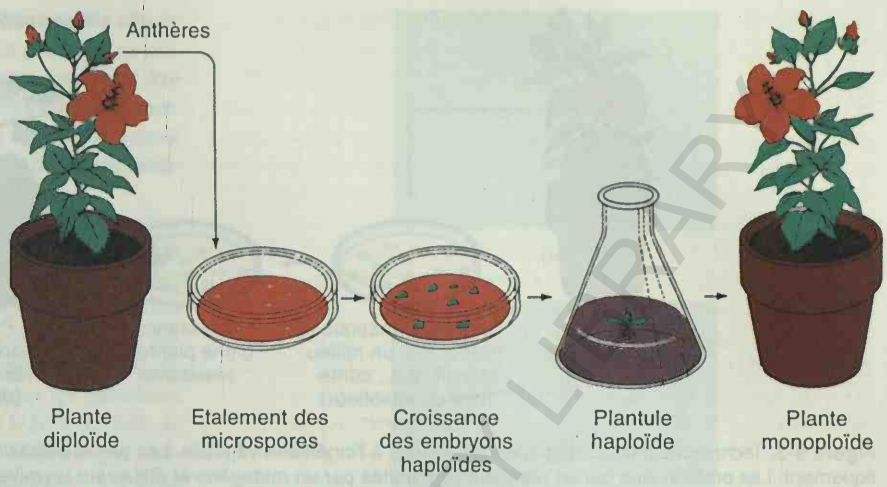


Figure 9-1. Obtention d'un monoploïde par culture de tissus. Des grains de pollen (haploïdes) sont étalés à un stade approprié sur un milieu gélosé contenant des substances de croissance végétales. Dans ces conditions, des embryons haploïdes se développent en plantules monoploïdes. Une modification de la nature des substances de croissance permettra d'obtenir des plantes monoploïdes adultes avec racines, tiges, feuilles et fleurs.

tement de mutagénèse-sélection. En digérant la paroi de cellules isolées par des enzymes, on obtient des protoplastes qui sont ensuite traités par un mutagène. Ils sont étalés sur un milieu sélectif (contenant tantôt un composé toxique normalement produit par un parasite, tantôt un insecticide) pour sélectionner des cellules résistantes. Les plantules résistantes qui se développeront en plantes haploïdes peuvent être diploïdisées par la colchicine et former une lignée pure résistante (figure 9-3).

Ceci représente une technique riche de potentialités qui permet de circonvenir le processus traditionnel très lent de l'amélioration des plantes basé sur la méiose. Elle a été appliquée avec succès à plusieurs plantes cultivées importantes, comme le soja et le tabac. Ceci constitue en fait un autre aspect de la génétique de cellules somatiques, appliquée aux organismes supérieurs.

La technique d'obtention de monoploïdes par la culture d'anthères n'est pas applicable à tous les organismes ou à tous les génotypes représentés chez un organisme. Une autre technique utile a été élaborée chez une céréale, l'orge. Lorsque une orge diploïde (*Hordeum sativum*) est pollinisée par un diploïde sauvage apparenté (*Hordeum bulbosum*), la fécondation a lieu. Cependant, au cours des divisions cellulaires somatiques qui s'ensuivent, les chromosomes de *H. bulbosum* sont éliminés préférentiellement, donnant naissance à un embryon haploïde. (Le processus d'haploïdisation semble être dû à une incompatibilité génétique entre les chromosomes des deux espèces.) Les haploïdes qui en résultent voient leurs chromosomes doublés par traitement à la colchicine. Cette méthode a conduit à l'obtention rapide et à la mise en culture de plusieurs nouvelles variétés d'orge. Elle a également été utilisée avec succès chez d'autres espèces.

Message Les monoploïdes sont utilisés par les généticiens pour créer de nouveaux génotypes qui sont ensuite doublés pour produire des lignées diploïdes, homozygotes et fertiles.

Polyploïdes

Parmi les polyploïdes, il nous faut distinguer les **autopolyploïdes**, constitués de jeux multiples de chromosomes appartenant tous à une seule espèce, des **allopolyploïdes**, formés de jeux de chromosomes provenant d'espèces différentes. Les allopolyploïdes ne se forment qu'entre espèces fortement apparentées ;

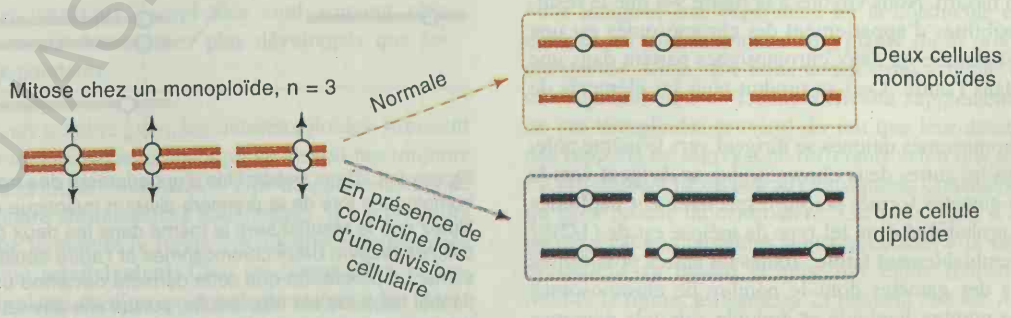


Figure 9-2. Utilisation de la colchicine pour produire un diploïde à partir d'un monoploïde. La colchicine administrée à des cellules en mitose pendant la métaphase et l'anaphase désorganise la mise en place des fibres du fuseau, empêchant la séparation des chromatides après la scission du centromère. Une cellule unique est formée contenant des paires de chromosomes identiques, homozygotes pour l'ensemble des loci.

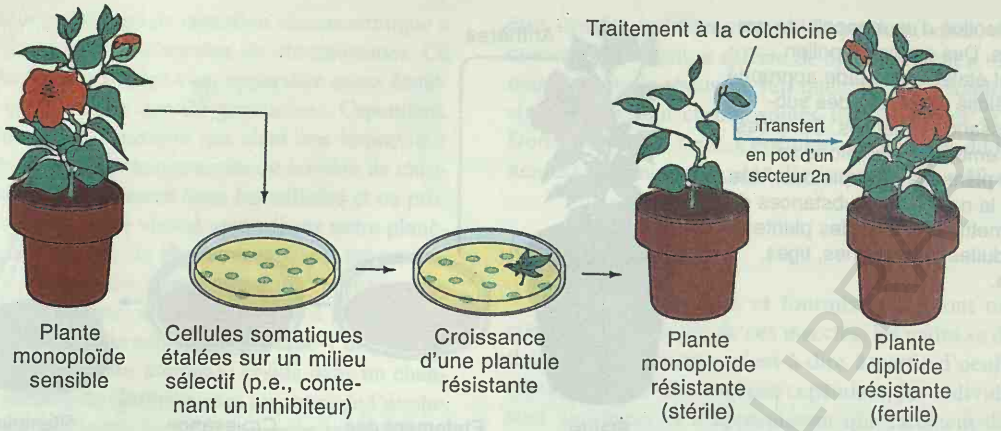


Figure 9-3. Techniques microbiologiques appliquées à l'ingénierie végétale. Les parois cellulaires de cellules haploïdes sont digérées enzymatiquement. Les protoplastes qui en résultent sont traités par un mutagène et étalés sur un milieu gélosé contenant un agent sélectif, par exemple un composé toxique produit par le parasite d'une plante. Seules les cellules porteuses d'une mutation de résistance leur permettant de survivre en présence de cette toxine, croîtront. En présence des substances de croissance adéquates, ces cellules donneront lieu à des plantes monoploïdes, qui seront converties en plantes diploïdes homozygotes par traitement à la colchicine.

notons que les différentes garnitures chromosomiques sont alors dites **homéologues** (partiellement homologues) et non complètement homologues comme c'est le cas pour les autopolyploïdes.

Triploïdes

Les triploïdes sont habituellement des autopolyploïdes. Ils apparaissent spontanément dans la nature et sont produits par les généticiens par un croisement d'un $4x$ (tétraploïde) et d'un $2x$ (diploïde). Les gamètes $2x$ et x s'unissent pour former un triploïde $3x$.

Les triploïdes se caractérisent par leur stérilité. L'origine en est - comme chez les monoploïdes -un problème d'appariement à la méiose. L'appariement ne peut se faire qu'entre deux chromosomes, mais l'un des chromosomes peut s'apparier avec l'un des partenaires sur une partie de sa longueur et avec l'autre pour la partie restante. Ceci donnera lieu à l'association de trois chromosomes. Les chromosomes appariés du type trouvé chez les diploïdes sont appelés **bivalents**. L'association de trois chromosomes correspond à un **trivalent**, et les chromosomes non-appariés sont appelés **univalents**. Du fait des deux possibilités d'appariement chez les triploïdes, le résultat en est soit un trivalent, soit un bivalent plus un univalent. Les centromères appariés migrent aux poles opposés de la cellule, mais des centromères non-appariés segrègent au hasard. Nous voyons à la figure 9-4 que le résultat final des possibilités d'appariement des chromosomes est une ségrégation non-balancée où deux chromosomes partent dans une direction et un dans l'autre. Ceci se produit pour les éléments de chaque trivalent.

Si tous les chromosomes uniques se dirigent vers le même pôle, et en même temps les autres deux chromosomes se dirigent vers le pôle opposé, les gamètes formés seront respectivement haploïdes et diploïdes. La probabilité d'un tel type de méiose est de $(1/2)^{x-1}$ et elle sera vraisemblablement faible. Toutes les autres possibilités donneront lieu à des gamètes dont le nombre de chromosomes oscillera entre le nombre haploïde et diploïde ; de tels génomes sont dits **aneuploïdes** ("non-euploïdes"). Il est à penser que ces gamètes aneuploïdes ne donneront pas de descendants viables et ce facteur est responsable de la presque totale stérilité des triploïdes. Le problème est dû au **déséquilibre génomique,** un phénomène que nous rencontrerons souvent au cours de ce chapitre. Pour la plupart des organismes la garniture chromosomique représente une situation fonctionnelle constitué d'un ensemble de gènes dont les proportions relatives sont parfaitement balancées. Des multiples de ce type de garniture sont tolérés parce qu'ils n'entraînent pas de changement dans les proportions relatives des gènes. Cependant, l'addition d'un ou de plus d'un chromosome en excès est pratiquement toujours défavorable car les rapports entre gènes sont

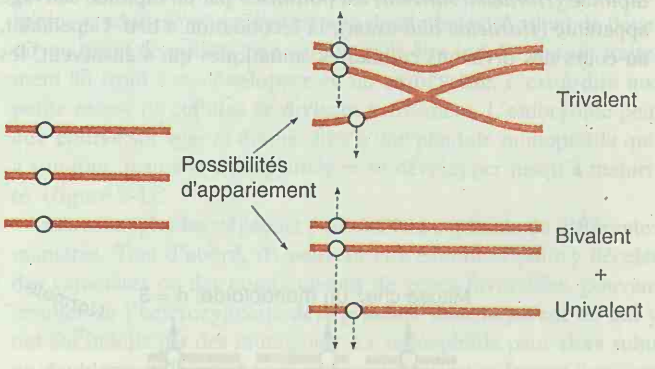


Figure 9-4. Deux possibilités d'appariement des trois chromosomes homologues lors de la première division méiotique d'un triploïde. Notez que le résultat sera le même dans les deux cas : l'une des cellules recevra deux chromosomes et l'autre seulement un chromosome. La probabilité que cette dernière devienne un gamète fonctionnel haploïde est très réduite, puisqu'elle devrait recevoir un seul des trois chromosomes homologues de chacun des autres jeux chromosomiques de l'organisme. Notez que chaque chromosome comporte en fait deux chromatides.

altérés. Quoique l'action de certains gènes peut être régulée afin de compenser la "dose" de gènes en excès, l'impact global de ce surplus de matériel génétique semble trop important que pour être atténué par la régulation génique. L'effet délétère peut s'exprimer chez les gamètes, les rendant non-fonctionnels, ou chez le zygote entraînant de la létalité, de la stérilité et une perte de valeur adaptative.

Dans le cas des triploïdes, il est possible que certains gamètes haploïdes ou diploïdes soient formés et que certains d'entre eux fusionnent pour former un zygote euploïde, mais la probabilité d'un tel évènement est intrinsèquement faible. Considérons le cas des bananes. Les bananes disponibles dans le commerce sont triploïdes avec 11 chromosomes par garniture chromosomique de base. La probabilité qu'au cours d'une méiose tous les univalents se dirigent vers le même pôle est de $(1/2)^{x-1}$ ou $(1/2)^{10}= 1/1024$, de sote que les bananes sont de fait stériles, ce qui s'exprime par l'absence de graines dans les fruits que nous consommons. Un autre exemple d'une exploitation commerciale de la triploïdie chez les plantes a trait au melon d'eau triploïde. Pour les mêmes raisons que celles décrites dans le cas de la banane, les melons triploïdes sont dépourvus de graines ce qui les rend aptes à la consommation.

Message : Certains types de mutations chromosomiques sont par elles-mêmes aneuploïdes ; d'autres types conduisent à la formation de gamètes ou de zygotes aneuploïdes. L'aneuploïdie a presque toujours des conséquences défavorables du fait du déséquilibre génique - le rapport entre gènes est différent de celui des euploïdes et ceci perturbe le fonctionnement normal du génome.

Autotétraploïdes

Les **autotétraploïdes** apparaissent soit naturellement par doublement spontané et accidentel d'un génome $2x$ en un génome $4x$, soit suite à l'utilisation de colchicine. De nombreuses plantes cultivées économiquement importantes sont des autotétraploïdes parce que — et ceci est valable pour d'autres types de polyploïdes — un nombre plus élevé de jeux de chromosomes est souvent associé à une augmentation de la taille de la plante. Ceci se manifeste par une taille accrue des cellules, des fruits, des stomates, etc. (figure 9-5). Un autre effet peut s'expliquer par le nombre de gènes. On peut présumer que la quantité d'ADN ou de protéines est proportionnelle aux nombres de gènes dans la cellule, et donc plus élevée chez les cellules polyploïdes.

Message : Les végétaux polyploïdes sont souvent plus grands et présentent des organes plus développés que les diploïdes correspondants.

Comme 4 est un nombre pair, les autotétraploïdes subissent généralement une méiose normale, quoique ce ne soit pas toujours la règle. Le facteur critique réside dans le type d'appariement et de ségrégation des quatre chromosomes homologues. Il y a plusieurs possibilités comme le montre la figure 9-6. Quatre chromosomes appariés forment un **quadrivalent**. Chez les tétraploïdes, la formation de deux bivalents ou d'un quadrivalent conduit à des ségrégations régulières, mais une ségrégation 2 :2 n'est pas assurée. Si cette ségrégation 2 :2 se réalise pour chaque chromosome, comme c'est le cas chez certaines espèces, les gamètes seront fonctionnels

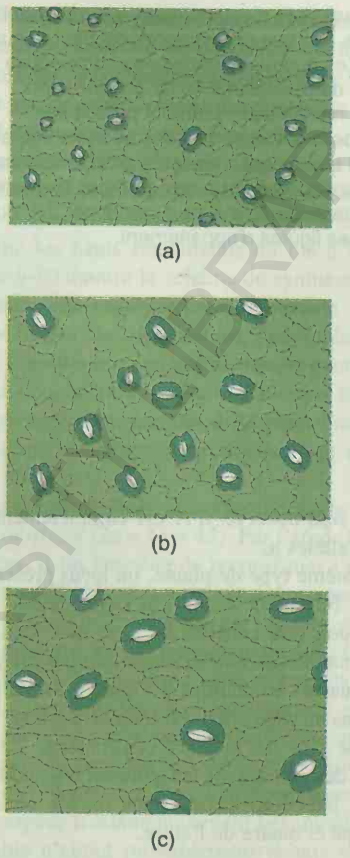


Figure 9-5. Cellules d'épiderme de feuilles de tabac, montrant l'accroissement de la taille des cellules lié à l'autopolyploïdie, particulièrement chez les stomates. (a) Diploïde. (b) Tétraploïde. (c) Octaploïde (parties a, b, c extraites de W. Williams, *Genetic Principles and Plant Breeding*, Blackwell Scientific Publications, Ltd.).

et une analyse génétique formelle de ces tétraploïdes sera possible.

Considérons la génétique d'un tétraploïde fertile. Nous pouvons imaginer une expérience où la colchicine est utilisée pour doubler les chromosomes d'une plante *Aa* et produire une plante tétraploïde *AAaa*, que nous considérons comme caractérisée par une ségrégation $2 \leftrightarrow 2$. Une difficulté supplémentaire dans le cas de ces tétraploïdes provient du fait que leur descendance produit des rapports de ségrégation différents selon que le locus en cause est étroitement lié ou non au centromère. Considérons tout d'abord un gène proche du centromère. Les trois types d'appariements et de ségrégations possibles sont représentés à la figure 9-7 ; ils se produisent au hasard et avec une égale fréquence. Comme le montre la figure, les gamètes $2x$ peuvent être *Aa*, *AA* ou *aa*, et produits dans un rapport de 8 : 2 : 2, ou de 4 : 1 : 1. Si une telle plante est autofécondée, la probabilité d'un phénotype *aaaa* dans la descendance sera de $\frac{1}{6} \times \frac{1}{6} = \frac{1}{36}$. En d'autres termes, un rapport phéno-

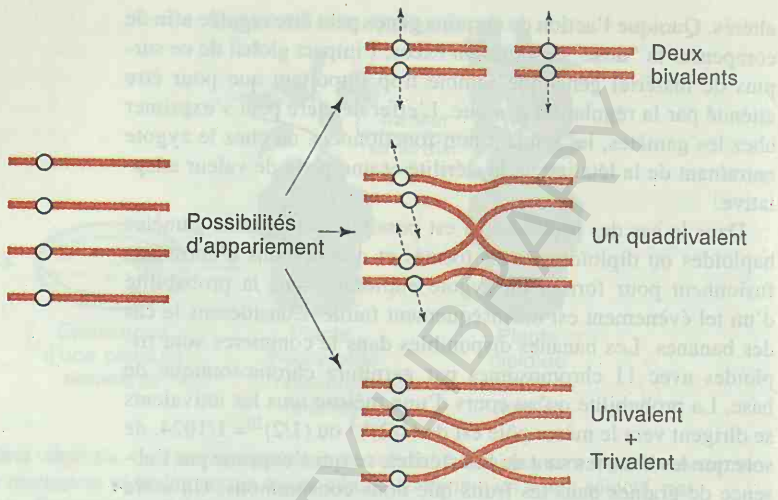


Figure 9-6. Possibilités d'appariement à la méiose chez des tétraploïdes (chaque chromosome comporte deux chromatides). Les quatre chromosomes homologues peuvent former deux bivalents ou un quadrivalent. Chacun de ces modes d'appariement produit des gamètes fonctionnels. Cependant, les quatre chromosomes peuvent aussi s'apparier selon une combinaison univalent-trivalent conduisant à des gamètes non-fonctionnels. Un tétraploïde donné peut comporter une ou plus d'une de ces figures d'appariement.

typique 35 : 1 sera observé si *A* est complètement dominant par rapport à trois allèles *a*.

Si, chez le même type de plante, un locus présentant les allèles *B* et *b* est très fortement distant du centromère, la possibilité de crossing-over doit être considérée. Ceci nous oblige à penser en terme de chromatides au lieu de chromosomes ; il y a quatre chromatides *B* et quatre chromatides *b* (figure 9-8). Puisque le nombre d'échanges dans un segment aussi long sera grand, les gènes apparaîtront comme non liés à leurs centromères. Le regroupement deux par deux des gènes dans les gamètes ressemblera au prélèvement de deux balles au hasard dans un sac en contenant huit, quatre d'un type et quatre de l'autre.

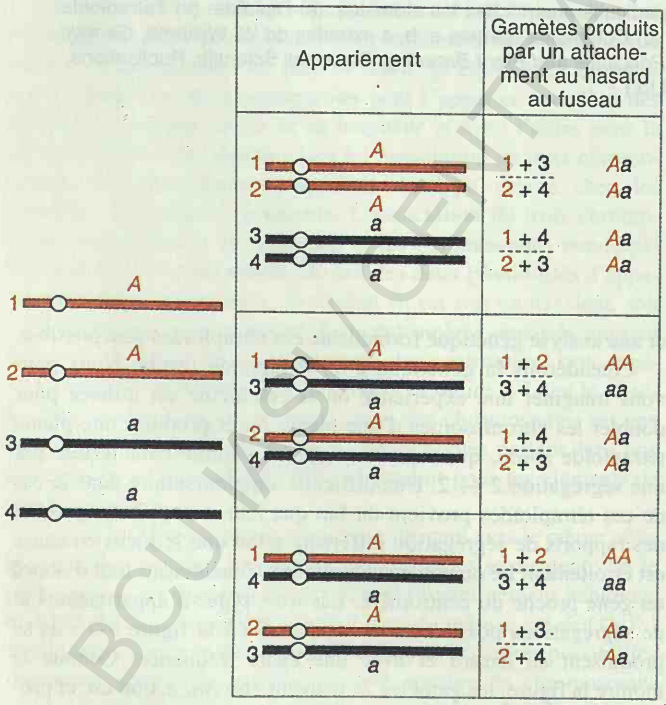


Figure 9-7. Ségrégation géniques chez un tétraploïde caracterisé par un appariement régulier sous forme de bivalents. (Chaque chromosome est en fait représenté par deux chromatides). Le locus présenté ici est proche du centromère. L'autofécondation peut produire toute une gamme de génotypes, y compris *aaaa*.

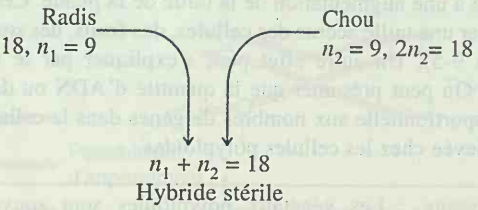
La probabilité de prélever 2 gènes *b* est donc

$$\tfrac{4}{8} \text{ (pour le premier)} \times \tfrac{3}{7} \text{ (pour le second)} = \tfrac{12}{56} = \tfrac{3}{14}$$

et la probabilité d'apparition suite à l'autofécondation du phénotype *bbbb* est de $\frac{3}{14} \times \frac{3}{14} = 9/196 \cong \frac{1}{22}$. Il s'ensuit un rapport phénotypique $B---:b\,b\,b\,b$ de 21 : 1. Des loci situés à des distances intermédiaires par rapport au centromère présenteront bien entendu des valeurs intermédiaires.

Allopolyploïdes

L'allopolyploïde «classsique» fut synthétisé par G. Karpechenko en 1928. Il désirait établir un hybride fertile ayant les feuilles du chou (*Brassica*) et les racines du radis (*Raphanus*). Chacune de ces espèces a 18 chromosomes et elles sont suffisamment apparentées pour être croisées. Une descendance hybride viable fut obtenue à partir des graines. Cependant, cet hybride s'avéra fonctionnellement stérile, les neuf chromosomes du chou étant suffisamment différents de ceux du radis pour empêcher une synapsis et une disjonction normales :



Cependant, un beau jour quelques graines furent produites par cet hybride (quasi) stérile. Le semis de ces graines livra des individus fertiles à 36 chromosomes. Tous ces individus sont allopolyploïdes. Ils étaient apparemment dûs à des doublements chromosomiques accidentels, spontanés ($2n_1 + 2n_2$) au sein de l'hybride stérile, probablement dans des tissus qui donneront lieu à la lignée germinale et subiront la méiose. Donc, dans des tissus $2n_1 + 2n_2$ des bivalents peuvent se former pour chaque chromosome et il en résulte des gamètes équilibrés de type $n_1 + n_2$. Ils fusionnent pour donner une descendance allopolyploïde $2n_1 + 2n_2$ qui est à son tour fertile. Ce type d'allopolyploïde est parfois dénommé **amphidiploïde** (figure 9-9). (Malheureusement pour Karpechenko, son amphidiploïde avait des racines de chou et des feuilles de radis !).

BCU VAUD / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

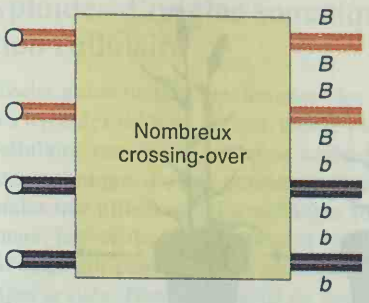


Figure 9-8. Représentation schématique de la méiose d'un tétraploïde comportant un locus hétérozygote éloigné du centromère. Quoique des tétravalents ne puissent être formés, l'effet des crossing-over multiples se produisant dans cette longue région sera de dissocier les gènes de leurs centromères originaux. Ces gènes s'associent par deux dans chaque gamète, de même que deux balles peuvent être prélevées au hasard dans un sac qui en contient huit : quatre d'un type et quatre de l'autre.

Lorsque l'allopolyploïde fut croisé avec chacune des espèces parentales, il en résulta une descendance stérile. Dans le cas du croisement avec le radis, ces descendants étaient $2n_1 + n_2$ formés à partir d'un gamète $n_1 + n_2$ de l'allopolyploïde et d'un gamète n_1 du radis. La stérilité observée résultait à coup sûr de l'absence de partenaires pour les chromosomes n_2. Par conséquent, Karpechenko avait effectivement créé une nouvelle espèce, sans possibilité d'échange de gènes avec chacun de ses parents. Il l'appela *Raphanobrassica.*

De nos jours, des allopolyploïdes sont couramment synthétisés par les sélectionneurs. Leur but est d'associer quelques particularités intéressantes des deux espèces parentales chez un seul individu. Le résultat de ce type d'entreprise est assez imprévisible, comme Karpechenko en a fait l'expérience. En fait, un seul amphidiploïde d'un grand intérêt potentiel a jamais été produit intentionnellement. Il s'agit de *Triticale,* un amphidiploïde entre le blé (*Triticum,* $2n = 6x = 42$) et le seigle (*Secale,* $2n = 2x = 14$). Le *Triticale* combine les hauts rendements du blé à la rusticité du seigle. La figure 9-10 montre le schéma de synthèse du *Triticale.*

Dans la nature, l'allopolyploïdie représente un processus majeur de la spéciation chez les plantes. De nombreux exemples en sont connus. L'un d'entre eux concernant le genre *Brassica* est particulièrement démonstratif, comme l'illustre la figure 9-11. Dans ce cas, trois espèces parentales différentes ont été hybridées de toutes les façons possibles pour donner lieu à des espèces amphidiploïdes nouvelles.

Un allopolyploïde naturel de grand intérêt est le froment panifiable, *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$). Par l'étude d'espèces sauvages apparentées, il fut possible de reconstituer l'évolution probable du froment panifiable (figure 9-12). La méiose d'un blé présente toujours 21 paires de chromosomes. En outre, on a pu établir que chaque chromosome n'a qu'un partenaire spécifique (appariement homologue) et non cinq partenaires potentiels (appariement homéologue). La suppression de l'appariement entre chromosomes homéologues (qui provoquerait l'instabilité de l'espèce) est assurée par un gène *Ph* situé sur le long bras du chromosome 5 du génome B. Ce gène *Ph* assure donc un comportement génétique de diploïde à cette espèce fondamentalement hexaploïde. Sans *Ph,* le froment panifiable n'aurait probablement jamais vu le jour. On pourrait spéculer sur le point de savoir si la civilisation occidentale serait apparue ou se serait développée sans cette céréale et donc sans la mutation *Ph.*

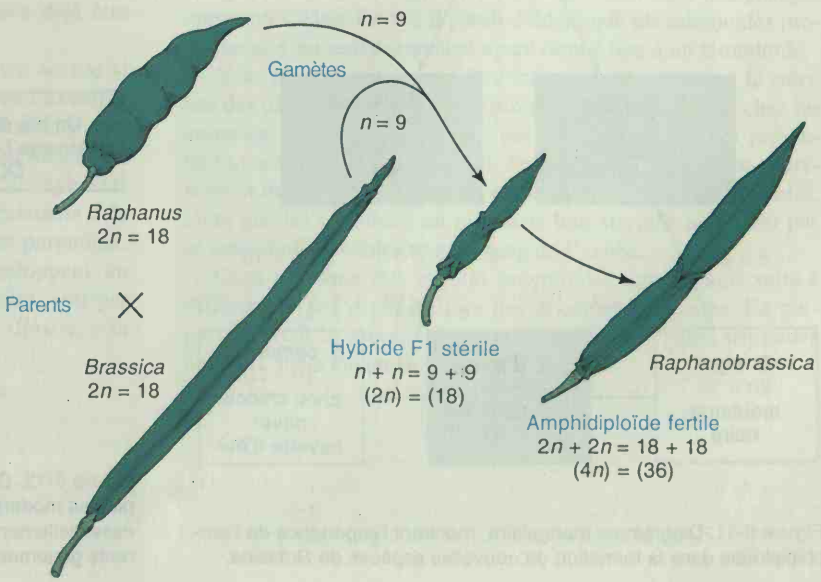
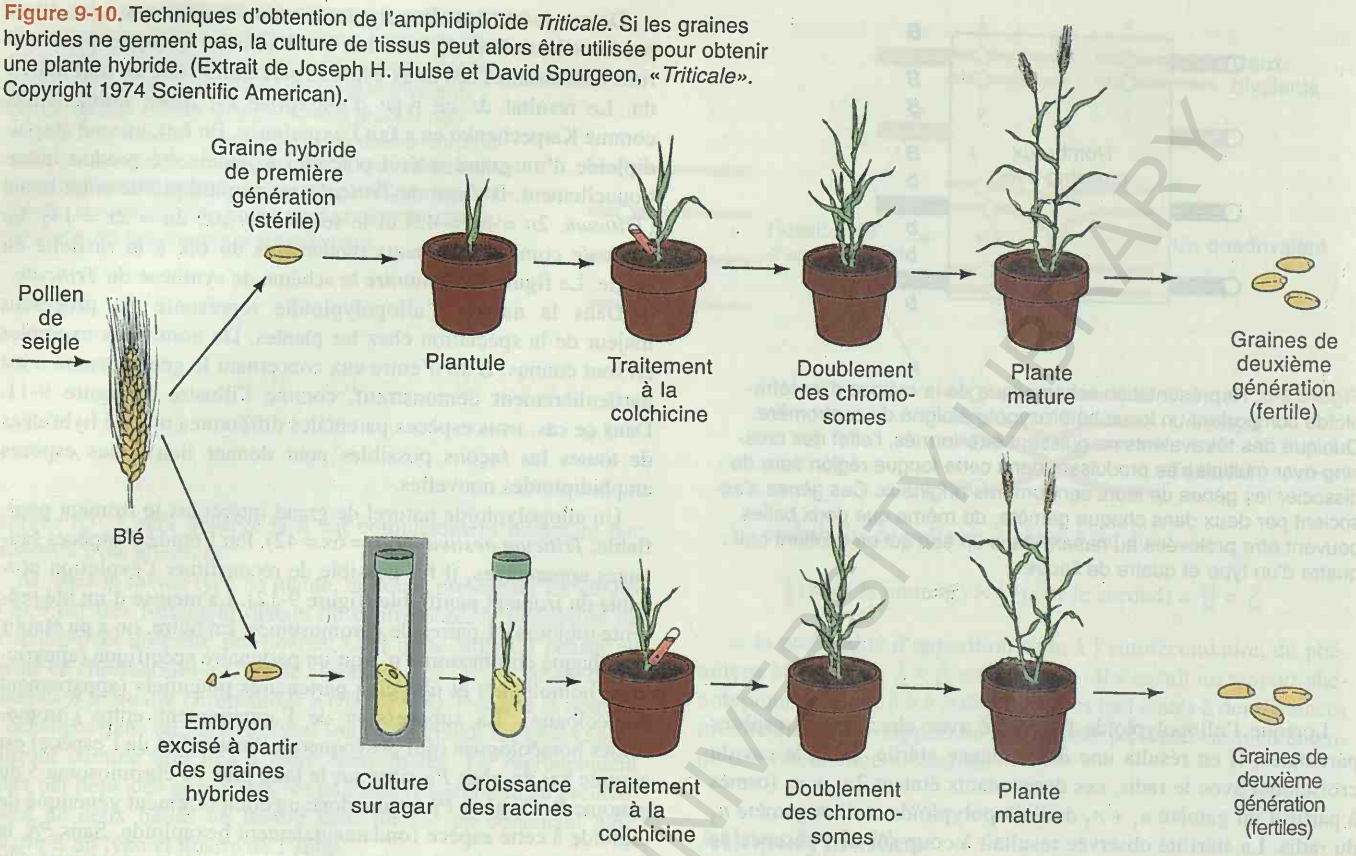


Figure 9-9. L'origine de l'amphidiploïde *Raphanobrassica* formé à partir du chou (*Brassica*) et du radis (*Raphanus*). La production de l'amphidiploïde fertile à partir de l'hybride $2n = 18$ se produisit de façon accidentelle, mais d'une manière semblable à la méthode de production de tétraploïdes par la colchicine. (Extrait de A.M. Srb, R.D. Owen, et R.S. Edgar, *General Genetics,* 2ième ed. Copyright W.H. Freeman and Company, 1965 . D'après G. Karpechenko, Z. *Indukt. Abst. Vererb.* 48, 1928, 27.)

Figure 9-10. Techniques d'obtention de l'amphidiploïde *Triticale*. Si les graines hybrides ne germent pas, la culture de tissus peut alors être utilisée pour obtenir une plante hybride. (Extrait de Joseph H. Hulse et David Spurgeon, «*Triticale*». Copyright 1974 Scientific American).



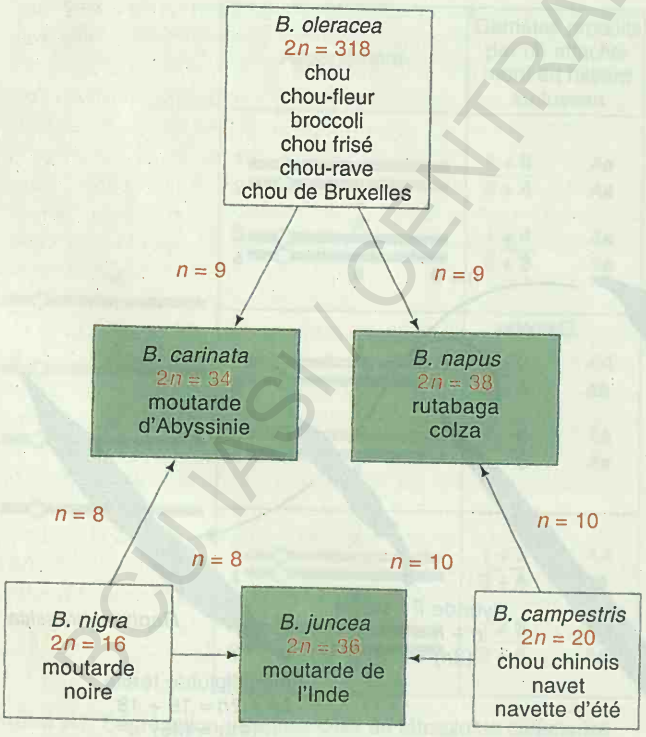


Figure 9-11. Diagramme triangulaire, montrant l'importance de l'amphidiploïdie dans la formation de nouvelles espèces de *Brassica*.

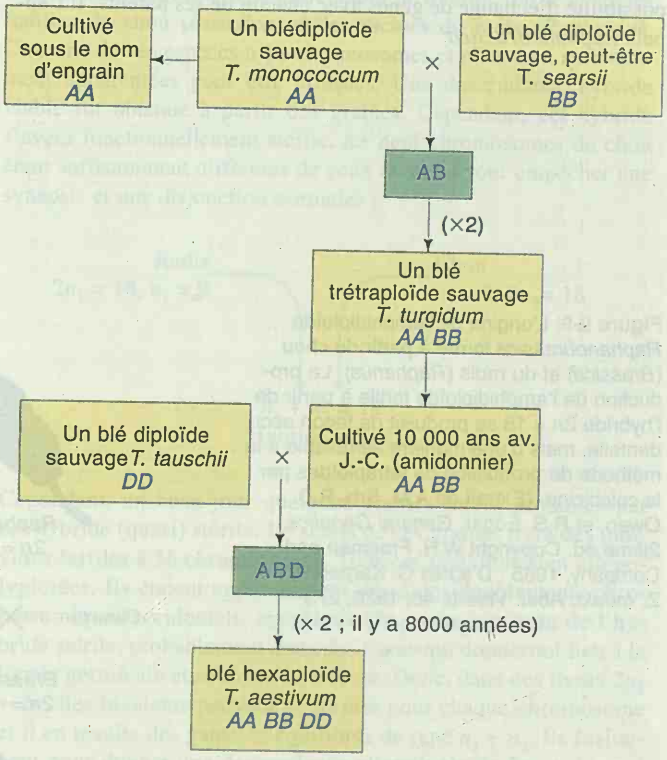


Figure 9-12. Diagramme de l'évolution possible des blés hexaploïdes modernes, faisant appel à la formation d'amphidiploïdes essentiellement en deux étapes. *A*, *B* et *D* représentent les différents génomes.

ACU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Allopolyploïdes d'origine somatique par hybridation cellulaire

Une approche nouvelle de l'amélioration des plantes consiste à créer des hybrides du type allopolyploïde par des méthodes de fusion cellulaire sans intervention de cellules sexuelles. En théorie, cette technique devrait permettre l'association d'espèces parentales très différentes. La technique fonctionne effectivement, mais les seuls allopolyploïdes obtenus à l'heure actuelle sont ceux qui peuvent l'être aussi par les méthodes de la reproduction sexuée. Dans le procédé de fusion cellulaire, on prépare des suspensions de cellules des deux espèces parentales et on digère leurs parois cellulaires par traitement enzymatique. Ces cellules nues sont appelées **protoplastes**. Les deux suspensions de protoplastes sont mélangées en présence de polyéthylèneglycol, qui stimule la fusion. Les cellules parentales et les produits de fusion prolifèrent sur un milieu gélosé et forment des colonies (de façon très semblable aux bactéries). Si ces colonies, ou *cals*, sont examinées, un nombre raisonnable d'entre elles s'avèrent être des hybrides allopolyploïdes à nombre de chromosomes équivalent à la somme des types parentaux. On peut en déduire que non seulement les membranes des protoplastes fusionnent pour former un hétérocaryon, mais aussi les noyaux.

Un autre exemple type d'hybride allopolyploïde est celui du tabac commercial, *Nicotiana tabacum*, qui a 48 chromosomes. Cette espèce, découverte dans la nature, est un amphidiploïde formé spontanément. Ses deux parents putatifs, *N. sylvestris* et *N. tomentosiformis* possèdent chacun 24 chromosomes. Un croisement entre *N. tabacum* et l'un ou l'autre de ses parents putatifs donne un hybride à 36 chromosomes formé de 12 b*ivalents* et de 12 chromosomes non appariés (*univalents*). Le croisement de *N. sylvestris* avec *N. tomentosiformis* produit un hybride à 24 chromosomes, sans appariement. Il est donc clair que le génome de *N. tabacum* est constitué en partie de celui de *N. sylvestris* et en partie de celui de *N. tomentosiformis*. Cet amphidiploïde peut être recréé soit sexuellement, par les étapes faisant intervenir la colchicine décrites précédemment, soit somatiquement par fusion de cellules. La fusion de cellules des espèces parentales putatives produit une lignée cellulaire à 48 chromosomes à partir de laquelle des plantes identiques à *N. tabacum* peuvent être obtenues. (Notez que cette méthode ne nécessite pas l'usage de la colchicine puisque le produit de fusion se trouve déjà être amphidiploïde.)

La récupération d'hybrides somatiques peut être accrue si l'on dispose d'un système de sélection. Considérons l'exemple de deux lignées monoploïdes de *N. tabacum* se caractérisant respectivement par des feuilles jaunâtres ou des feuilles blanchâtres et toutes deux sensibles à la lumière. Les cals hybrides (diploïdes, dans ce cas) se sont avérés verts et résistants à la lumière grâce à la complémentation entre génotypes parentaux. Les cals ont produit des plantules, qui se développent en plantes entières soit par greffe sur une plante adulte, soit par rempotage. Le protocole de cette expérience est illustré à la figure 9-13.

Deux allotétraploïdes de *Petunia*, l'un produit par croisement sexué et l'autre par hybridisation somatique sont comparés à la figure 9-14. On peut y voir que les deux types sont phénotypiquement identiques et donnent lieu à la même gamme de types dans la descendance.

Message Des allopolyploïdes peuvent être synthétisés par croisement d' espèces apparentées suivi du doublement des chromosomes de l'hybride ou par voie asexuée en fusionnant des cellules d'espèces différentes.

La polyploïdie chez les animaux

Vous avez noté peut-être que la plus grande partie de notre discussion consacrée à la polyploïdie n'a concerné que les plantes. Celle-ci est, en effet, plus répandue chez les plantes que chez les animaux, mais néanmoins des cas de polyploïdie existent chez des animaux tels que les vers plats, les sangsues et les crustacés brachiopodes. Dans ces cas, la reproduction se fait par **parthenogénèse** (développement d'un oeuf non-fertilisé en un embryon). Cependant, les exemples connus ne se confinent pas à ces organismes dits inférieurs. De manière surprenante, des polyploïdes ont été identifiés chez des amphibiens et des reptiles. Ceux-ci se caractérisent par des modes de reproduction multiples. Les grenouilles et crapauds polyploïdes comportent des mâles et des femelles impliqués dans le cycle sexuel alors que les salamandres et lézards sont parthénogénétiques.

Quelques poissons sont aussi polyploïdes, et dans deux cas il apparaît qu'un seul évenement de type polyploïde a donné lieu à une nouvelle famille taxonomique. Cette situation s'oppose à celle des amphibiens et des reptiles parce qu'ici les polyploïdes sont tous très proches des espèces diploïdes et que ces sauts polyploïdes n'apparaissent donc pas comme importants dans l'évolution de ces groupes. La famille des Salmonideae (à laquelle appartiennent la truite et le saumon) est un exemple classique d'un groupe apparu suite à la polyploïdie. Les salmonidés ont deux fois plus d'ADN que les poissons apparentés. Différentes espèces de salmonidés ont différents nombres de chromosomes, mais on a découvert que le groupe comporte un nombre invariable de bras de chromosomes (parfois fusionnés chez certaines espèces) représentant le double du nombre de bras présents dans des groupes apparentés. Dans ce cas, il paraît évident que les salmonidés proviennent d'un seul évenement ayant donné lieu à un tétraploïde.

Vous pourriez également être intéressé de savoir que la stérilité des triploïdes a aussi été exploitée commercialement chez les animaux. Des truites triploïdes ont été observées ; elles présentent un avantage commercial sur les types diploïdes. Ceux-ci présentent une période de frai où elles ne sont plus consommables, alors que les triploïdes, en raison de leur stérilité, ne fraient pas et sont consommables tout au long de l'année.

Chez l'homme, des zygotes polyploïdes sont produits suite à différents types d'erreurs lors des divisions cellulaires. La plupart meurent *in utero*. De temps en temps, des bébés triploïdes naissent, mais aucun ne survit.

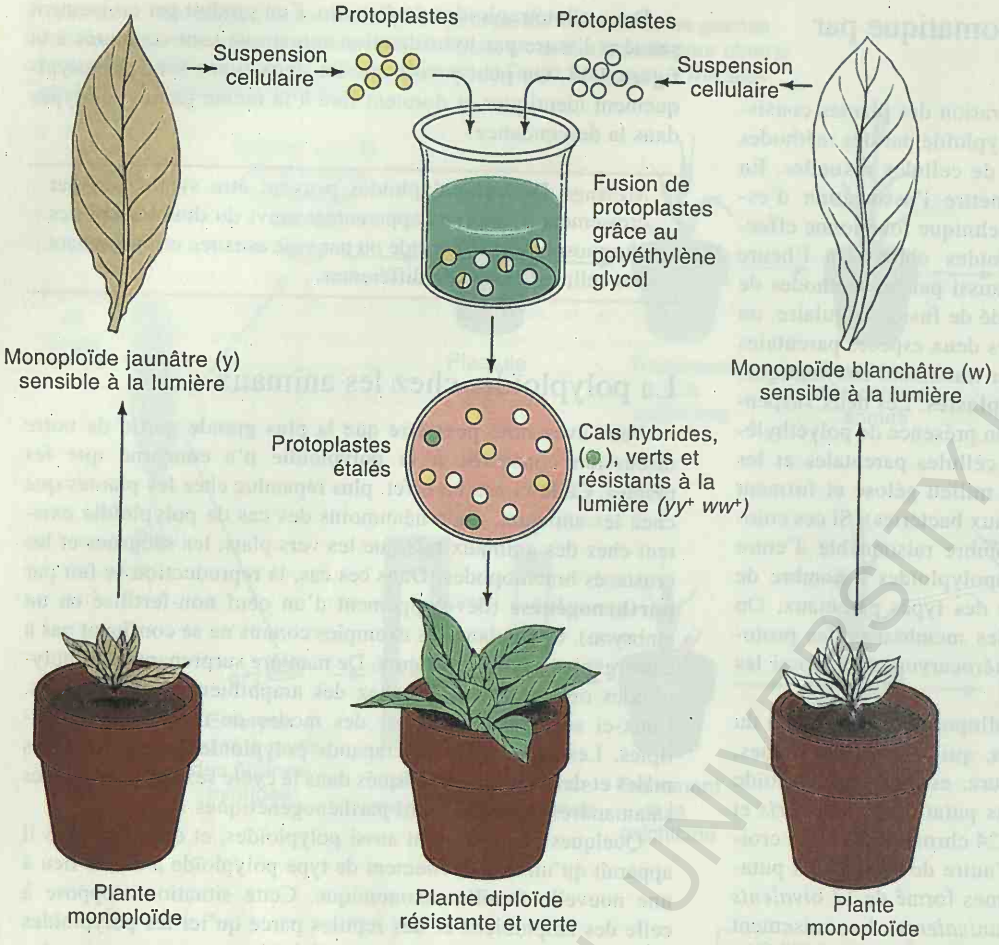


Figure 9-13. Création par fusion cellulaire d'un hybride à partir de deux lignées monoploïdes de *Nicotiana tabacum*. L'une des lignées possède des feuilles jaunâtres photo-sensibles et l'autre des feuilles blanchâtres également photo-sensibles. Des protoplastes sont produits par digestion enzymatique des parois des cellules de feuilles. Des fusions entre protoplastes des deux lignées peuvent se produire, comme indiqué ; celles qui se développent en cals hybrides sont résistantes à la lumière du fait de la récessivité des génotypes parentaux. Ces cals, grâce à un régime hormonal approprié, peuvent se développer en plantes vertes diploïdes.

Aneuploïdie

L'aneuploïdie constitue la seconde catégorie importante de mutations chromosomiques portant sur le nombre de chromosomes. Un aneuploïde est un individu dont le nombre chromosomique diffère de celui du sauvage par adjonction ou perte d'une partie de la garniture chromosomique. Généralement le nombre de chromosomes de l'aneuploïde ne diffère de celui du type sauvage que par un petit nombre de chromosomes, soit surnuméraires soit en moindre nombre par rapport au génome de départ. La nomenclature est basée sur le nombre de copies d'un chromosome spécifique impliqué dans le fait d'aneuploïdie. Par exemple, 2n-1 désigne un monosomique (ce qui signifie "un seul-chromosome") puisqu'une seule copie d'un chromosome donné est présente au lieu des deux classiquement représentées chez le diploïde originel. 2n + 1 désigne un **trisomique**, 2n-2 un **nullisomique** et n+1 un **disomique**.

Figure 9-14. L'hybridation sexuée et somatique produisent chez le *Pétunia* des allotétraploïdes identiques. Les deux lignées parentales sont representées en haut, rouge pour *P. hybrida* et blanche pour *P. parodii*. L'allotétraploïde F_1, de la rangée centrale provient du croisement des deux parents diploïdes suivi du doublement de nombre de chromosomes ; l'allotétraploïde à côté est le produit d'une fusion somatique entre les deux lignées parentales. Les deux allotétraploïdes produisent la même gamme de descendants, comme illustré. Les nombres indiquent les plantes utilisées dans des expériences ultérieures (J.B. Power).

Nullisomiques (2*n* - 2)

Quoique la nullisomie entraîne la léthalité chez les vrais diploïdes, un organisme comme le blé (qui se comporte en diploïde mais est en fait hexaploïde) peut tolérer la nullisomie. Les quatre chromosomes homéologues compensent la perte d'une paire d'homologues. Les 21 types possibles de nullisomiques ont été obtenus chez le blé ; ils sont illustrés à la figure 9-15. Leurs phénotypes diffèrent de celui d'un blé hexaploïde normal ; en outre, la plupart d'entre eux se caractérisent par une croissance moins vigoureuse.

Monosomiques (2*n* - 1)

Des garnitures chromosomiques de type monosomique sont généralement dommageables pour deux raisons. Tout d'abord, la balance chromosomique, soigneusement mise en place au cours du processus évolutif et nécessaire pour atteindre une homéostasie cellulaire finement régulée, est profondément altérée. (Nous avons rencontré ce type d'effet précédemment.) Deuxièmement, toute mutation récessive défavorable sur le chromosome présent en un seul exemplaire devient hémizygote et peut s'exprimer aussitôt phénotypiquement. Notez que des effets identiques sont provoqués par des délétions.

La **non-disjonction** à la mitose ou la méiose est la cause de la plupart des aneuploïdes. La disjonction consiste en la séparation normale des chromosomes homologues ou chromatides vers les pôles opposés de la cellule lors de la division du noyau. La non-disjonction désigne un raté dans ce processus et il en résulte que deux chromosomes se retrouvent à un pôle et aucun à l'autre. La non-disjonction se produit spontanément, mais le processus moléculaire en cause n'est pas connu. On sait, cependant, que dans certains systèmes expérimentaux la fréquence de non-disjonction peut être augmentée en perturbant le fonctionnement des microtubules.

Au cours de la méiose les chromosomes peuvent ne pas se séparer soit à la première, soit à la seconde division (figure 9-16). Dans chaque cas *n +1* et *n* - 1sont produits. Si un gamète n-1 est fécondé par un gamète *n* il en résulte un zygote monosomique (*2n-1*). La fusion d'un gamète *n+1* et *n* conduit à un trisomique *2n+1*.

Chez l'homme, le monosomique ayant trait au chromosome sexuel (44 autosomes + 1X) se caractérise par un phénotype dit du syndrome de Turner. Les personnes atteintes sont aisément reconnaissables : il s'agit de femmes stériles, courtaudes et présentant souvent un repli cutané entre la nuque et les épaules (Figure 9-17). Leur intelligence est quasi normale, quoique certaines fonctions cognitives leur fassent défaut. Leur fréquence est d'environ de 1 sur 5000 naissances de filles. Les monosomiques pour n'importe quel autosome humain meurent à l'état d'embryons.

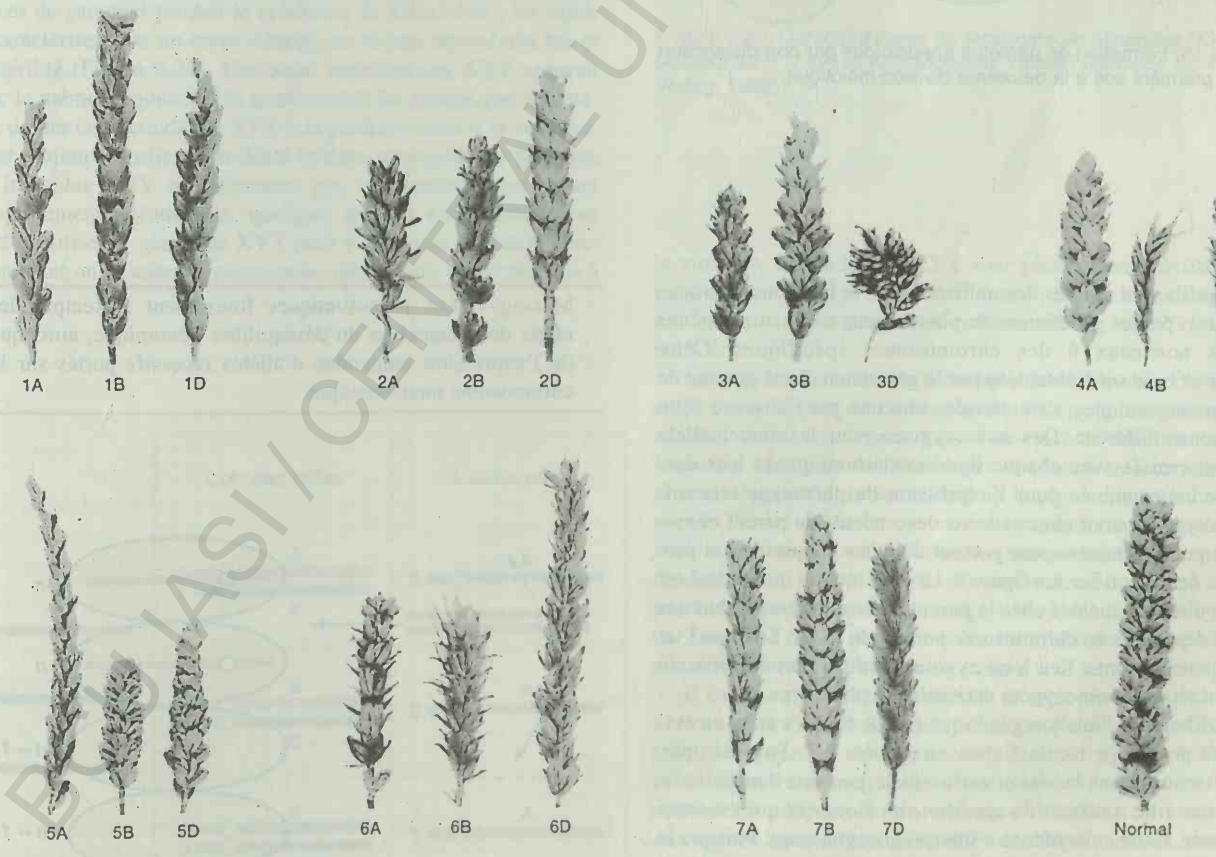


Figure 9-15. Les nullisomiques du blé. Quoique les nullisomiques soient le plus souvent létaux chez des diploïdes, des organismes comme le blé qui ont tendance à se comporter en tant que diploïdes, mais sont en fait hexaploïdes, peuvent tolérer la nullisomie. Cependant les nullisomiques présentent une croissance moins vigoureuse. (E.R. Sears.)

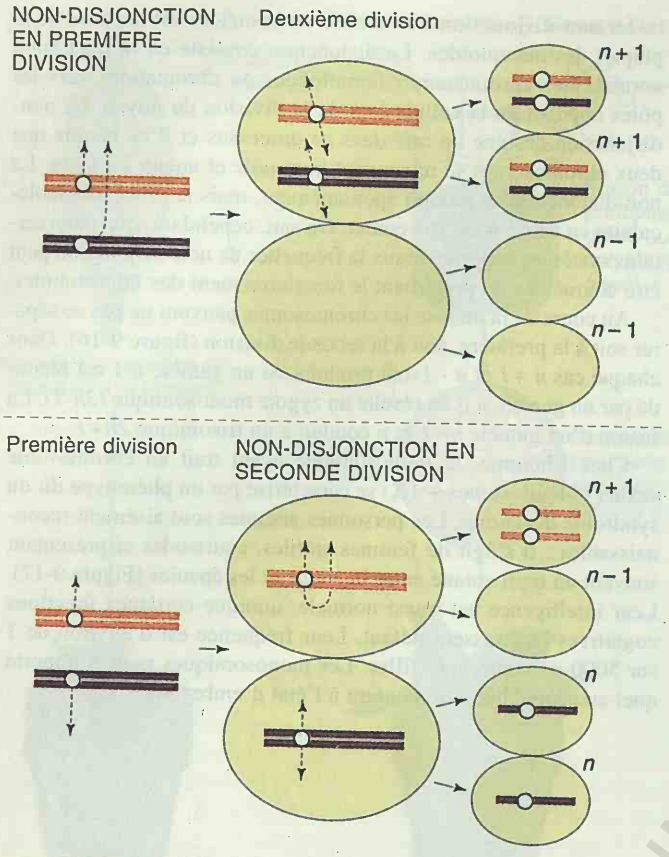


Figure 9-16. Formation de gamètes aneuploïdes par non-disjonction soit à la première soit à la deuxième division méiotique.

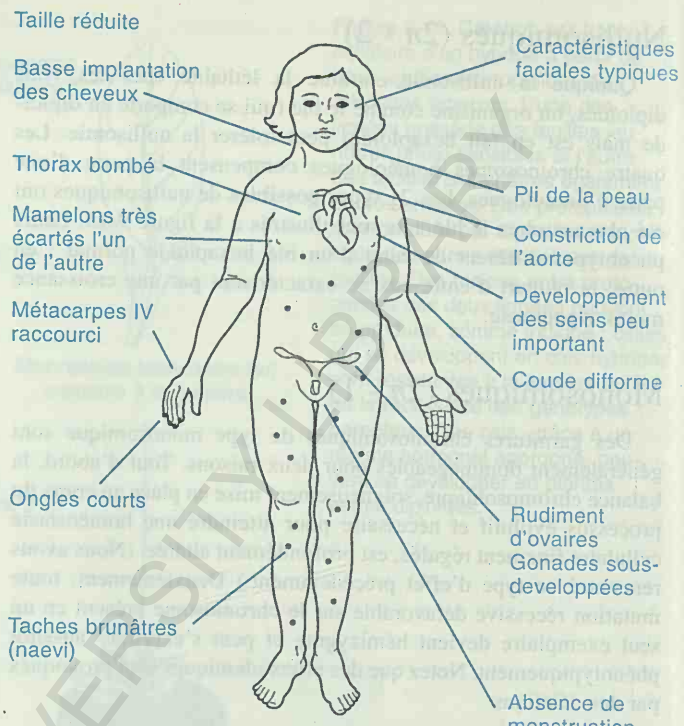


Figure 9-17. Caractéristiques du syndrome de Turner (XO : présence d'un seul chromosome X). (Adapté de F. Vogel et A.G. Motulsky, *Human Genetics*, Springer-Verlag, 1982).

Lorsqu'ils sont viables, les nullisomiques et les monosomiques sont utilisés par les généticiens de plantes pour attribuer des gènes récessifs nouveaux à des chromosomes spécifiques. Cette approche se base sur l'obtention par le généticien d'une gamme de lignées monosomiques, caractérisées chacune par l'absence d'un chromosome différent. Des homozygotes pour le nouvel allèle muté sont croisés avec chaque lignée monosomique et leur descendance est examinée pour l'expression du phénotype récessif. Le phénotype apparaît chez certains descendants du parent monosomique pour le chromosome porteur du locus en question et permet donc de l'identifier. La figure 9-18 nous montre que ce test est valable puisque la méiose chez le parent monosomique produit des gamètes dépourvus du chromosome porteur du locus. Lorsque l'un de ces gamètes donne lieu à un zygote, l'unique chromosome dû au parent récessif homozygote détermine le phénotype.

Chez l'homme, l'analyse génétique met de temps à autre en évidence un phénotype récessif chez un gamète *n-1*. Par exemple, deux personnes dont la vision est normale peuvent donner naissance à une fille souffrant du *syndrome de Turner* et qui est aussi daltonienne. Cette coïncidence s'interprète comme suit. Puisque le père n'est pas daltonien, la mère devait être hétérozygote pour l'allèle récessif et l'avoir transmis à sa fille souffrant du syndrome de Turner. La non-disjonction doit s'être produite chez le père,entraînant la formation d'un spermatozoïde *n-1* qui s'est associé avec l'oeuf porteur de l'allèle du daltonisme.

Message Les monosomiques fournissent l'exemple des effets dommageables du déséquilibre génomique, ainsi que de l'expression inattendue d'allèles récessifs portés sur le chromosome monosomique.

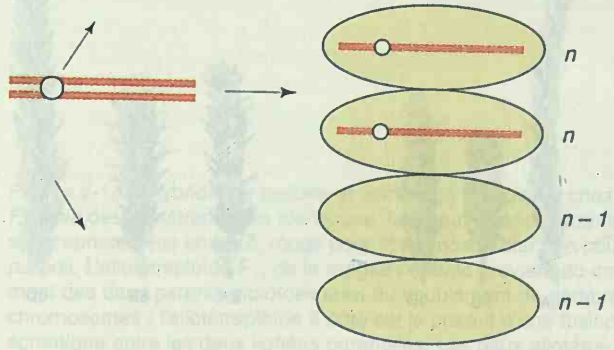


Figure 9-18. Comportement à la méiose d'un chromosome monosomique. Deux des gamètes produits contiennent un jeu haploïde de chromosomes (*n*) ; les autres contiennent un jeu où le chromosome monosomique du parent n'est pas représenté (*n* - 1).

MASTER CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Trisomiques ($2n + 1$)

La trisomie est aussi l'une des situations de déséquilibre chromosomique pouvant entraîner des anomalies ou la mort. De nombreux exemples de trisomiques viables sont cependant connus. Nous avons déjà étudié le cas des trisomiques de la stramoine (*Datura)* repris au chapitre 3 (voire figure 3-8). En outre, des trisomiques peuvent être fertiles. Si des cellules de certains organismes trisomiques sont examinées au microscope au moment de l'appariement à la meïose, les chromosomes trisomiques forment des trivalents, alors que les autres chromosomes ne forment que les classiques bivalents. Quels rapports génétiques peut-on attendre de gènes situés sur le chromosome trisomique ? Considérons un gène *A* situé près du centromère sur ce chromosome et disons que le génotype est *Aaa*. En outre, en postulant que deux des centromères se séparent vers des pôles opposés comme chez un bivalent normal, et que le chromosome surnuméraire se répartit au hasard à l'un ou l'autre pôle, nous pouvons prédire que tous les types de ségrégations représentées à la figure 9-19 se produisent à la même fréquences . Ces ségrégations aboutissent à un rapport entre gamètes de *1A :2Aa :2a :1aa*. Ce rapport ainsi que celui ayant trait à *AAa* s'observent pratiquement. Si un individu trisomique testeur est disponible (de façon très semblable au testeur nullisomique discuté auparavant), une nouvelle mutation pourra être localisée sur un chromosome donné à condition de déterminer lequel des testeurs conduira au rapport particulier.

Plusieurs exemples de trisomiques viables ont été signalés chez l'espèce humaine. La combinaison XXY (un cas sur 1000 naissances de garçons) produit le syndrome de Klinefelter ; les sujets se caractérisent par un corps allongé, un niveau mental très bas et la stérilité (Figure 9-20). Une autre combinaison, XYY apparaît avec la même fréquence. Un grand intérêt fut suscité par la tentative de lier cette condition XYY à la prédisposition à la violence. C'est toujours le sujet d'un débat brûlant, quoiqu'il soit clair que les individus XYY ne présentent pas systématiquement un tel comportement. Néanmoins, quelques avocats entreprenants ont tenté d'utiliser le génotype XYY pour fonder une demande d'acquittement ou susciter la compassion dans le cas de crimes dus à la violence. Les individus XYY sont généralement fertiles. Leurs méïoses sont de type XY : le chromosome Y surnuméraire n'est pas transmis, et les gamètes ne contiennent que X ou Y, jamais YY ou XY.

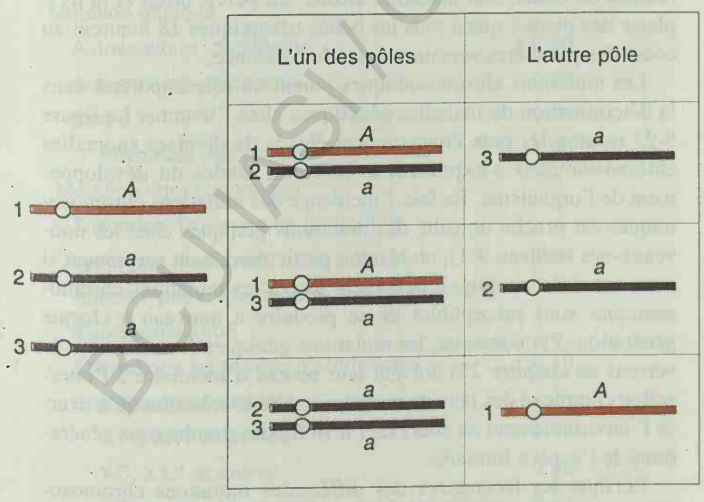


Figure 9-19. Génotypes des produits de la méiose d'un trisomique *Aaa*. Les trois types de ségrégation sont également probables.

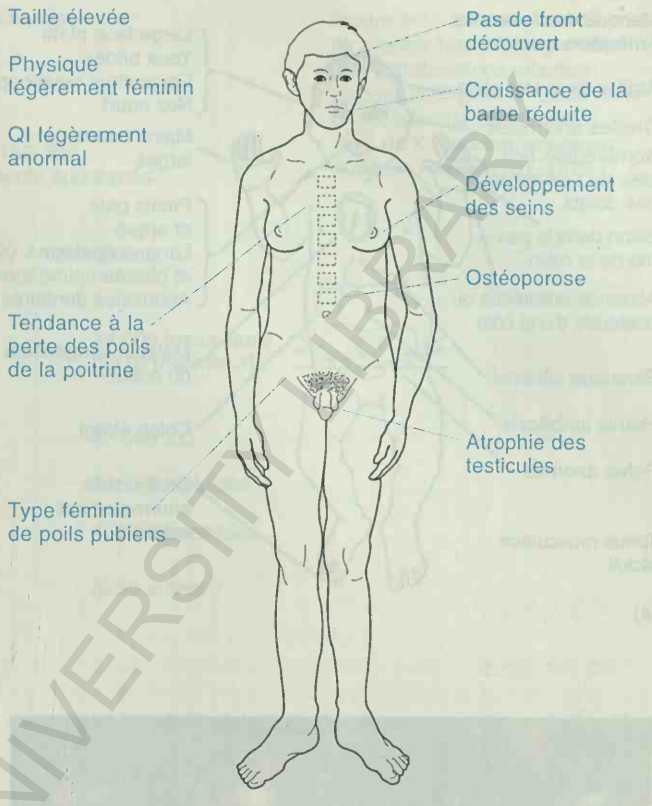


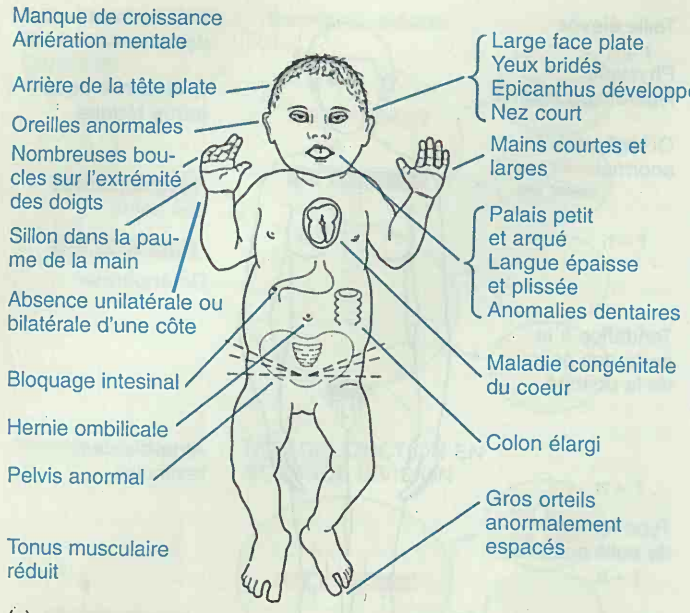
Figure 9-20. Caractéristiques du syndrome de Klinefelter (XXY) (Adapté de F. Vogel et A.G. Motulsky, *Human Genetics*, Springer-Verlag, 1982).

Le type le plus commun d'aneuploïde viable chez l'homme est celui du syndrome de Down (figure 9-21), qui se présente dans environ 0.15% des naissances. Nous avons déjà mentionné la forme du syndrome de Down associé à une translocation au chapitre 8. Cependant, la forme de loin la plus commune du syndrome de Down est due à une non-disjonction du chromosome 21 chez un parent de garniture chromosomique normale. Comme tout mécanisme, la disjonction des chromosomes est sujette à erreur et produit parfois des gamètes aneuploïdes. Dans ce cas de syndrome de Down, il n'y a pas d'histoire familiale de l'aneuploïdie, au contraire du type dû à la translocation. .

Il existe un effet lié à l'âge de la mère dans le syndrome de Down : chez des mères âgées, le risque d'avoir des enfants souffrant du syndrome de Down est plus élevé (Figure 9-22). Pour cette raison , une analyse des chromosomes du foetus (par amniocentèse ou prélèvement de villosités choriales) est recommandé aux mères âgées. Quoique l'effet de l'âge maternel soit connu depuis de nombreuses années, sa cause n'est pas encore connue. Un effet de l'âge paternel - mais nettement moins prononcé - a aussi été démontré.

Les anomalies dues au syndrome de Down se traduisent par un retard mental, associé à un Q.I. dans la gamme de 20 à 50, un visa-

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY



(a)

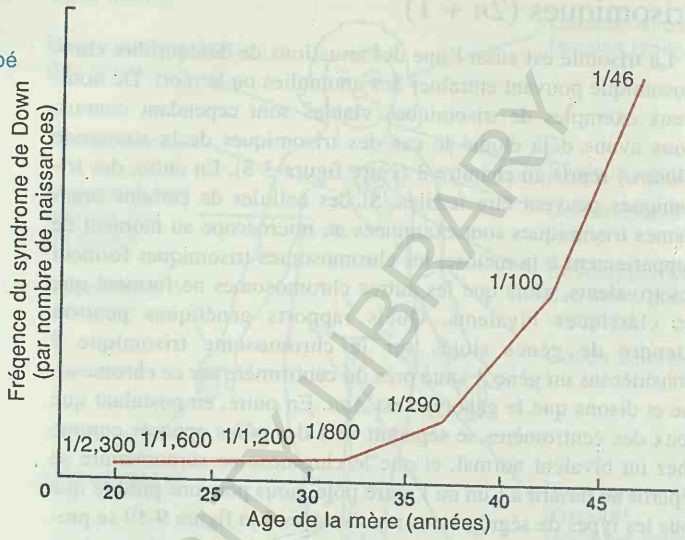


Figure 9-22. Relation entre l'âge maternel et l'apparition du syndrome de Down dans la descendance. (Extrait de L.S. Penrose et G.F. Smith, *Down's anomaly.* Little, Brown and Company, 1966)

Figure 9-21. Caractéristiques du syndrome de Down (trisomie 21). (a) Schéma représentant le syndrome chez un enfant . (b) Athlètes atteints du syndrome de Down. (Partie a adaptée de F. Vogel et A.G. Motulsky, *Human Genetics*, Springer-Verlag, 1982 ; partie b issue de Bob Daemmrich/The Image Works.).

ge rond et plat, des yeux à épicanthus développé, une taille réduite, de courtes mains creusées d'un sillon et une grosse langue plissée. Les femmes sont fertiles, et peuvent donner naissance à une descendance normale ou trisomique, mais les hommes sont stériles. L'espérance moyenne de vie est de 17 ans et 8 pour cent seulement des individus atteints vivent au delà de 40 ans.

Seuls deux autres cas de trisomie autosomique, la trisomie 13 (syndrome de Patau) et la trisomie 18 (syndrome d'Edwards) permettent la survie après la naissance. Dans les deux cas, les enfants atteints sont sévèrement handicapés physiquement et mentalement. Le phénotype du trisomique 13 comporte un bec de lièvre, un crânepetit et malformé, la dysplasie des pieds, et une espérance de vie de 130 jours. Celui du trisomique 18 se caractérise par des oreilles de faune, une mâchoire étroite, un pelvis étroit et la dysplasie des pieds ; quasi tous les bébés trisomiques 18 meurent au cours des premières semaines après la naissance.

Les mutations chromosomiques jouent un rôle important dans la détermination de maladies génétiques chez l'homme. La figure 9-23 résume les taux étonnamment élevés de diverses anomalies chromosomiques s'exprimant à différents stades du développement de l'organisme. En fait, l'incidence des mutations chromosomiques est proche de celle des mutations géniques chez les nouveaux-nés (tableau 9-1), un résultat particulièrement surprenant si nous considérons que virtuellement toutes les mutations chromosomiques sont susceptibles de se produire à nouveau à chaque génération. Par contraste, les mutations géniques (comme nous le verrons au chapitre 25) doivent leur niveau d'incidence à l'interaction complexe des taux de mutations et de la sélection qu'a exercé l' environnement au cours de l'histoire des nombreuses générations de l'espèce humaine.

Lorsque les fréquences des différentes mutations chromosomiques lors des naissances et des avortements spontanés sont com-

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

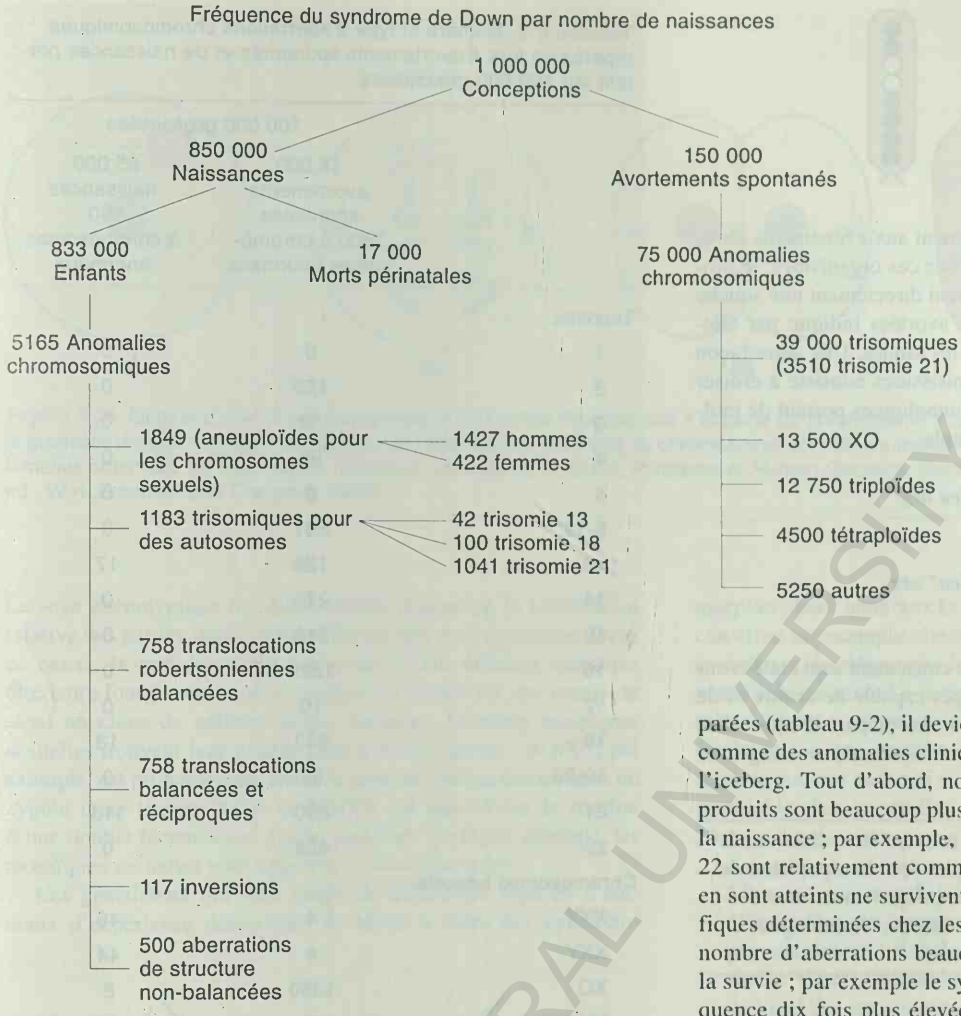


Figure 9-23. Le sort d'un million de zygotes humains implantés. (Les translocations robertsoniennes impliquent la fusion ou la dissociation de centromères). (Issu de K. Sankaranarayanan, *Mutation Research* 61, 1979.)

Tableau 9-1. Fréquence relative de maladies humaines dues aux mutations de gènes et de chromosomes

Type de mutation	Pourcentage des enfants en vie à la naissance
Mutation génique	
Autosomique, dominante	0,90
Autosomique, récessive	0,25
Liée à X	0,05
Ensemble des mutations géniques	1,20
Mutation chromosomique	
Trisomies d'autosomes (surtout le syndrome de Down)	0,14
Autres types d'aberrations non balancées d'autosomes	0,06
Aberrations balancées d'autosomes	0,19
Chromosomes sexuels	
XYY, XXY et autres	0,17
XO, XXX et autres	0,05
Ensemble des mutations chromosomiques	0,61

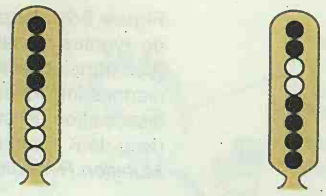
parées (tableau 9-2), il devient clair que ces mutations répertoriées comme des anomalies cliniques, ne représentent que le sommet de l'iceberg. Tout d'abord, nous voyons que les types d'anomalies produits sont beaucoup plus nombreux que ceux qui s'expriment à la naissance ; par exemple, les trisomies des chromosomes 2, 16 et 22 sont relativement communes chez les avortons, mais ceux qui en sont atteints ne survivent jamais. Ensuite, les aberrations spécifiques déterminées chez les survivants ne sont qu'une partie d'un nombre d'aberrations beaucoup plus grand qui ne permettent pas la survie ; par exemple le syndrome de Down se produit à une fréquence dix fois plus élevée que celle déterminée à la naissance. Cela est encore plus frappant dans le cas du syndrome de Turner (XO). On a pu estimer qu'environ 10 pour cent des foetus possèdent une anomalie chromosomique majeure ; notre succès sur le plan de la reproduction dépend du processus naturel d'élimination de la plupart de ces anomalies avant la naissance. Entre parenthèses, aucun fait évident ne permet de penser que ces aberrations soient produites par une agression du milieu vis-à-vis de notre système de reproduction, ou encore que la fréquence des aberrations soit en augmentation

Message Les trisomiques mettent en lumière les effets dommageables du déséquilibre génomique et donnent lieu à des rapports phénotypiques modifés spécifiques du chromosome concerné.

Disomiques (n+1)

Un disomique constitue une anomalie concernant un organisme haploïde. Chez les champignons, il est clair qu'il peut être le produit d'une non-disjonction méiotique. Chez *Neurospora* (un haploïde), un produit méiotique *n-1* avorte et ne se colore pas comme une ascopore normale. Il est donc possible de distinguer des non-disjonctions en M1 et M2 en repérant les asques présentant respectivement un rapport 4 :4 et 6 :2 de spores normales à spores avortées, comme montré ci-dessous.

BOSTASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Ces diagrammes correspondent exactement aux événements chromosomiques décrits à la figure 9-16. Chez ces organismes, le produit disomique (n+1) de la méiose devient directement une souche disomique. La distribution des spores avortées indique par elle-même la présence de disomiques dans les asques. Une autre façon de répérer les disomiques chez ces moisissures consiste à croiser deux souches dont des chromosomes homologues portent de multiples mutations auxotrophes, par exemple

$$\frac{ade\ his^{+}\ nic\ ala^{+}\ leu\ arg^{+}}{ade^{+}\ his\ nic^{+}\ ala\ leu^{+}\ arg} \times$$

De nombreuses ascospores issues de ce croisement sont étalées sur un milieu minimum. Les seuls génotypes capable de croître et de former des colonies sont + + + + + +. La plupart d'entre elles s'avérèrent être disomiques et non pas le résultat de crossing-over multiples.

Message Des individus disomiques peuvent être sélectionnés chez les champignons à partir d'asques dont la répartition de spores avortées est particulière, ou en sélectionnant une descendance qui doit contenir des chromosomes homologues en provenance de chacun des deux parents.

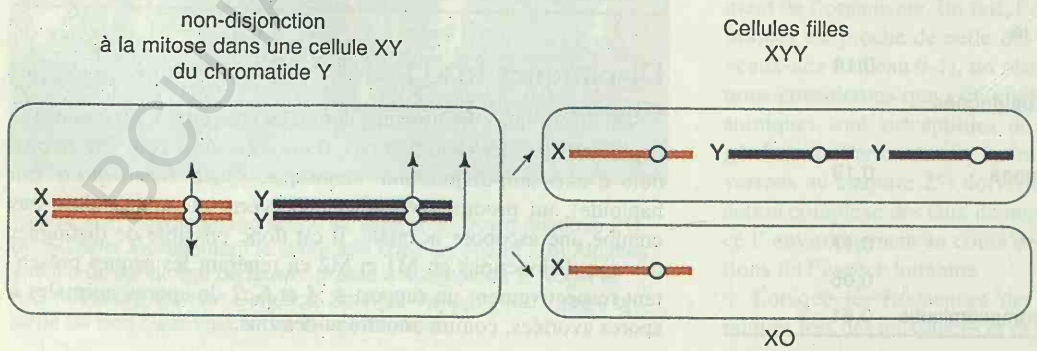
Aneuploïdes somatiques

Des cellules aneuploïdes peuvent apparaître spontanément dans des tissus somatiques ou dans des cultures de tissus. Dans de tels cas, le résultat est la formation d'une mosaïque génétique de types cellulaires, dont des exemples existent chez l'homme.

L'existence de mosaïques sexuelles — des individus dont certaines cellules ont des formules chromosomiques de type mâle, les autres de type femelle — en constitue un premier exemple. Un type de mosaïque sexuelle, XO/XYY peut s'expliquer en postulant un zygote XY chez lequel la non-disjonction du chromosome Y se produit au cours d'une division mitotique précoce de telle sorte que les deux chromatides se dirigent vers un seul des deux pôles :

Tableau 9-2. Nombre et type d'aberrations chromosomiques répertoriés lors d'avortements spontanés et de naissances portant sur 100.000 grossesses.

	100.000 grossesses	
	15.000 avortements spontanés 7500 à chromosomes anormaux	85.000 naissances 550 à chromosomes anormaux
Trisomie		
1	0	0
2	159	0
3	53	0
4	95	0
5	0	0
6-12	561	0
13	128	17
14	275	0
15	318	0
16	1229	0
17	10	0
18	223	13
19-20	52	0
21	350	113
22	424	0
Chromosomes sexuels		
XYY	4	46
XXY	4	44
XO	1350	8
XXX	21	44
Translocations		
balancées	14	164
non-balancées	225	52
Polyploïdes		
Triploïde	1275	0
Tétraploïde	450	0
Autre (mosaïque, etc.)	280	49
Total	7500	550



BCU LAUSANNE CENTRALE UNIVERSITY LIBRARY

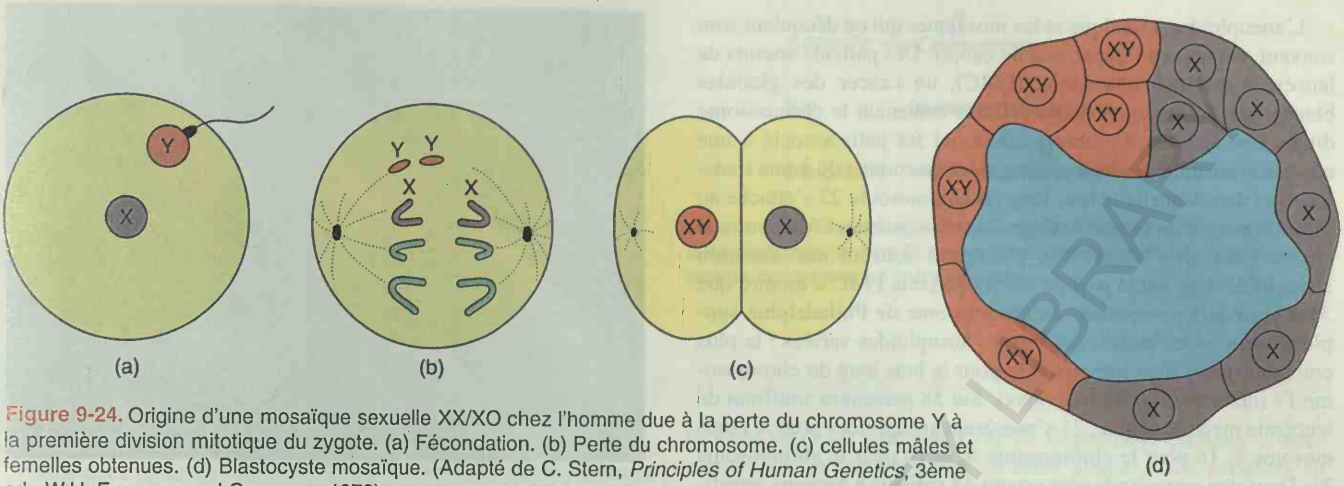


Figure 9-24. Origine d'une mosaïque sexuelle XX/XO chez l'homme due à la perte du chromosome Y à la première division mitotique du zygote. (a) Fécondation. (b) Perte du chromosome. (c) cellules mâles et femelles obtenues. (d) Blastocyste mosaïque. (Adapté de C. Stern, *Principles of Human Genetics*, 3ème ed., W.H. Freeman and Company, 1973).

Le sexe phénotypique de tels individus dépend de la localisation relative des parties mâles et femelles au sein de l'organisme. Dans ce cas-ci, la non-disjonction au cours d'une division mitotique ultérieure fournit une triple mosaïque XY/XO/XYY, qui comporte aussi un clone de cellules mâles normales. D'autres mosaïques sexuelles trouvent leur génèse dans d'autres causes : XO/XY, par exemple, est probablement due à la perte de chromosomes chez un zygote mâle (figure 9-24) et XX/XY est sans doute le résultat d'une double fécondation (fusion jumelle). De façon générale, les mosaïques sexuelles sont appelées *gynandromorphes*.

Les généticiens qui font usage de différentes espèces d'animaux d'expérience découvrent de temps à autre des gynandromorphes dans leurs stocks. La drosophile de la figure 9-25 en constitue un example classique. Le zygote issu d'une femelle se caractérise au départ par le génotype w^+m^+/wm implicant deux gènes liés au sexe. La perte du chromosome X sauvage à la première division mitotique donne lieu à deux lignées cellulaire et finalement à une mouche dont un côté diffère de l'autre par le sexe, la couleur de l'oeil et la taille de l'aile. Un gynandromorphe semblable chez le papillon nocturne Io est présenté à la figure 9-26.

Message La non-disjonction mitotique et d'autres types d'anomalies du comportement de chromosomes mitotiques peuvent donner lieu à des mosaïques formées de deux ou plusieurs types cellulaires chromosomiquement distincts et incluant des aneuploïdes.

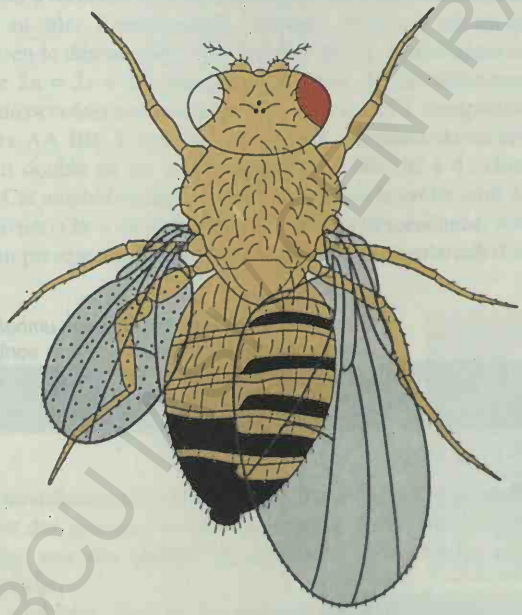


Figure 9-25. Un gynandromorphe bilatéral chez *Drosophila*. Le zygote est w^+m^+/wm mais la perte du chromosome w^+m^+ en cours de la première division mitotique produit une mouche 1/2 O/*wm* et mâle (à gauche) et 1/2 w^+m^+/wm et femelle (à droite). L'allèle mutant *w* produit des yeux blancs, et *m* des ailes miniatures.

Figure 9-26. Un gynandromorphe bilatéral chez le papillon, *Automeris io io*. Une moitié du corps est femelle et porte la mutation liée au sexe «oeil brisé» ; l'autre moitié du corps est mâle et possède l'allèle normal du gène de l'oeil brisé. Ce papillon nocturne est dû à un évènement similaire à celui qui a conduit à la drosophile gynandromorphe de la Figure 9-25. Les différences de couleur et de taille sont toutes deux liées au sexe (T.R. Manley).

BCU LAUSANNE CENTRALE UNIVERSITAIRE LIBRARY

L'aneuploïdie somatique et les mosaïques qui en découlent sont souvent associées à l'apparition du cancer. Des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC), un cancer des globules blancs, présentent souvent des cellules contenant le chromosome dit de Philadelphie. Ce chromosome qui fut jadis associé à une condition aneuploïde, est à présent reconnu comme dû à une translocation dans laquelle le bras long du chromosome 22 s'attache au bras long du chromosome 9. Cependant, les patients LMC, outre le chromosome de Philadelphie, présentent souvent une situation aneuploïde. Une étude portant sur 67 patients LMC a montré que 33 d'entre eux possédaient un chromosome de Philadelphie supplémentaire et les autres, des formes aneuploïdes variées : la plus commune concernait une trisomie pour le bras long du chromosome 17 (détectée chez 28 individus). Sur 58 personnes souffrant de leucémie myéloïde aigue, 21 s'avérèrent aneuploïdes pour le chromosome 8, 16 pour le chromosome 9, et 10 pour le chromosome 21. Dans une autre étude concernant 15 patients à tumeurs intestinales, 12 présentaient des chromosomes anormaux, avec, chez certains, une trisomie pour le chromosome 8, 13, 15, 17, ou 21. Bien entendu, il s'agit ici de simples corrélations et il n'est pas évident que les anomalies doivent être considérées, soit comme la cause, soit comme un effet du cancer.

Message Les aneuploïdes sont produits par non-disjonction ou par d'autres anomalies de la ségrégation des chromosomes à la méiose ou à la mitose.

L'ingénierie chromosomique dans l'amélioration des plantes

Ce que nous savons des mutations chromosomiques peut conduire à une forme d'ingéniérie génétique pour maintenir et

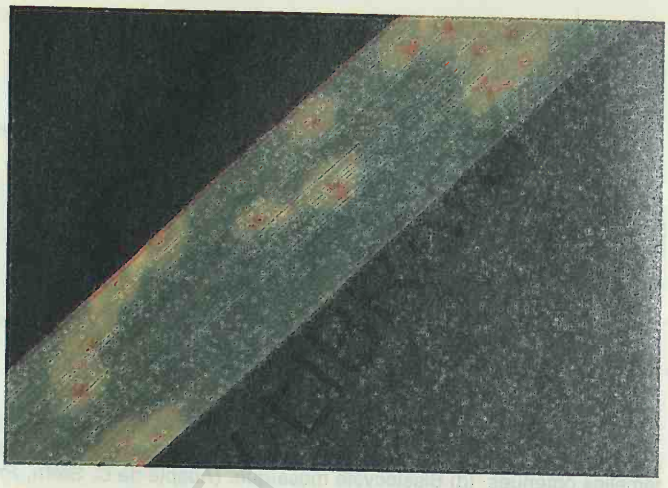


Figure 9-27. Une feuille de blé infectée par un champignon de la rouille, dont le nom provient des zones de couleur rouille dues aux spores du champignon produits au centre des zones infectées. De nombreux types de rouilles sont pathogènes chez de nombreuses plantes cultivées dont les céréales, le pin et le café. Ces infections causent chaque année des pertes chiffrées en milliards de dollars, et un secteur important de l'amélioration des plantes se consacre à obtenir des lignées génétiques résistantes (V.A. Wilmot/Visuals Unlimited).

pour créer de nouveaux types de plantes cultivées dans un monde souffrant de la faim. Nous ne mentionnerons qu'une seule expérience, celle menée par E.R. Sears dans les années 1950. Il s'agissait de transférer un gène de résistance à la rouille foliaire provenant d'une herbe sauvage, *Aegilops umbellulata,* au blé panifiable (très susceptible à cette maladie) et ainsi de lever un obstacle majeur dans l'industrie du blé (figure 9-27).

Un premier obstacle se présenta à Sears. En l'occurrence, les deux espèces (figure 9-28) n'étaient pas interfertiles de telle sorte

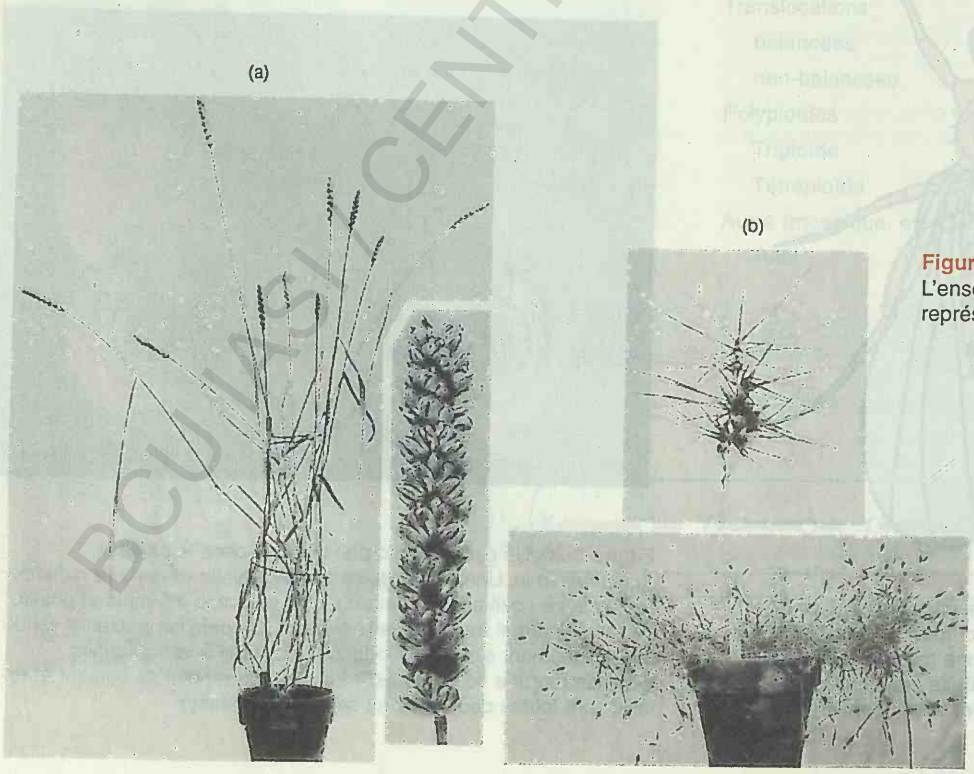


Figure 9-28. (a) Blé. (b) *Aegilops umbellulata.* L'ensemble de la plante et des épis sont représentés. (E. Sears)

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY

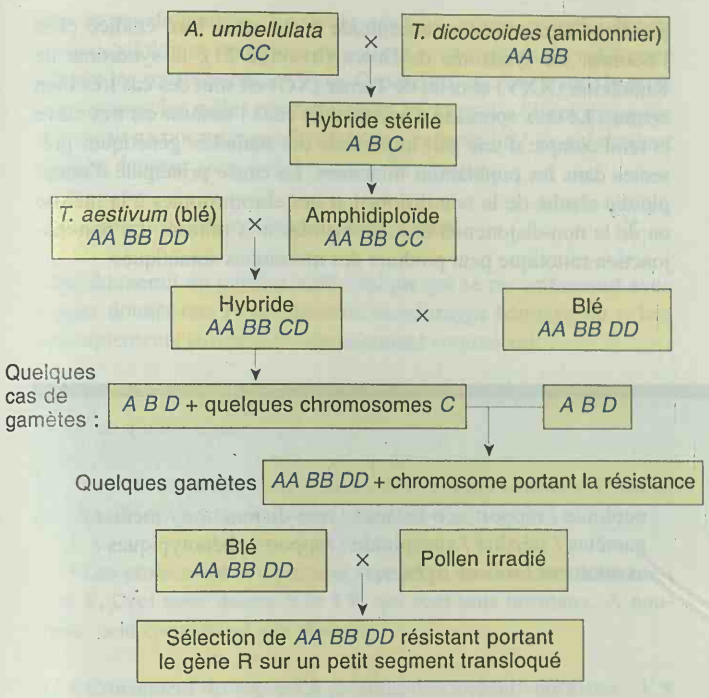


Figure 9-29. Résumé des étapes réalisées par Sears pour transférer la résistance à la rouille d'*Aegilops* au blé. *A, B, C* et *D* représentent des génomes d'origine différente. *R* indique le déterminant génétique (un gène unique ?) de cette résistance.

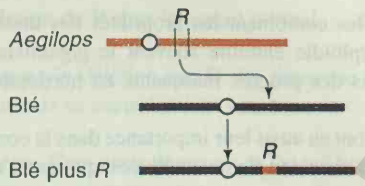


Figure 9-30. Translocation dans le génome du blé du segment d'*Aegilops* comportant *R*, basée sur l'effet des radiations comme moyen de casser des chromosomes.

que le transfert d'un gène de l'une à l'autre semblait impossible. Sears contourna ce problème par un croisement de pontage, consistant à féconder *A. umbellulata* par une espèce sauvage apparentée au blé, l'amidonnier sauvage, *Triticum dicoccoïdes*. (Suivez-en le déroulement à la figure 9-29.) *A. umbellulata* est un diploïde $2n = 2x = 14$. Désignons ses jeux de chromosomes par CC. *T. dicoccoïdes* est un tétraploïde, $2n = 4x = 28$, comportant les génomes AA BB. L'hybride stérile ABC résultant de ce croisement fut doublé en un amphidiploïde AA BB CC à 42 chromosomes. Cet amphidiploïde est fertile quand on le croise avec le blé (*T. aestivum*) ($2n = 6x = 42$, AA BB DD). La descendance, AA BB CD, était presque totalement stérile, suite aux irrégularités d'appariement entre les génomes C et D. Cependant, quelques croisements avec le blé fournirent de rares graines, dont certaines se développèrent en plantes résistantes à 43 chromosomes (42 en provenance du blé, plus un chromosome d'*Aegilops* porteur du gène de résistance). Donc, au sein de l'hybride AA BB CD un type aberrant de répartition des chromosomes a donné lieu à un gamète à 22 chromosomes : ceux dus à ABD plus un du groupe C.

Malheureusement, le chromosome surnuméraire comportait aussi de trop nombreux gènes indésirables d'*Aegilops* associés au gène intéressant, et il en résulta des plantes chétives et peu productives. La liaison aux autres gènes d'*Aegilops* devait donc être rompue. Sears mena ceci à bien en utilisant du pollen irradié de ces plantes pour féconder le blé. Il recherchait des translocations d'une partie du chromosome *d'Aegilops* attachées à l'un des chromosomes de blé. Bien qu'assez fréquentes, une seule d'entre elles s'avéra idéale — une translocation sous forme d'une *insertion* très limitée et uni-directionnelle (figure 9-30). A l'état homozygote, les plantes résistantes ne se distinguent pas du blé.

L'étude des mutations chromosomiques apparaît donc d'une grande importance — non seulement en biologie fondamentale, où des rapports peuvent être établis avec de nombreux domaines (particulièrement l'étude de l'évolution), mais aussi en biologie appliquée. L'application de ces méthodes est particulièrement importante dans les domaines de l'agriculture et de la médecine. Curieusement, le mécanisme moléculaire des mutations affectant le nombre de chromosomes est très mal connu. Nous avons besoin pour cela d'une connaissance détaillée de l'architecture chimique normale des chromosomes. Nous reviendrons sur ce sujet au chapitre 16.

RÉSUMÉ

Des modifications du nombre des chromosomes peuvent impliquer soit des génomes entiers et conduire à des cas d'euploïdie anormale, soit des parties de génomes, avec comme résultat l'aneuploïdie.

Les triploïdes ($3x$) et les tétraploïdes ($4x$) constituent des exemples de polyploïdes euploïdes qui s'observent fréquemment chez les plantes et sont même représentés chez les animaux. Un nombre impair de jeux de chromosomes entraîne la stérilité du fait du non-appariement des chromosomes à la méiose, alors qu'un nombre pair permet d'obtenir des rapports de ségrégation normaux. Les allopolyploïdes (polyploïdes juxtaposant des génomes d'espèces différentes) peuvent être obtenus par croisement de deux espèces apparentées suivi du doublement des chromosomes de l'hybride par colchicinisation ou par fusion somatique. Ces techniques trouvent un champ d'application important dans l'amélioration des plantes cultivées, puisque l'allopolyploïde crée de fait

des espèces nouvelles combinant les propriétés des deux espèces parentales. La polyploïdie entraîne souvent le gigantisme : cette découverte a permis des progrès marquants en horticulture et en sélection végétale.

Les aneuploïdes ont eu aussi leur importance dans la construction de génotypes définis chez des plantes cultivées, quoique l'aneuploïdie en soi produise un génotype non balancé déterminant un phénotype anormal. Des compléments chromosomiques monosomiques ($2n - 1$) et trisomiques ($2n + 1$) constituent des exemples d'aneuploïdie. Cette condition aneuploïde a été aussi bien étudiée chez l'homme. Le syndrome de Down (trisomie 21), le syndrome de Klinefelter (XXY) et celui de Turner (XO) en sont des cas très bien connus. Le taux spontané d'aneuploïdie chez l'homme est très élevé et rend compte d'une part importante des maladies génétiques présentes dans les populations humaines. La cause principale d'aneuploïdie résulte de la non-disjonction des chromosomes à la méiose ou de la non-disjonction des chromatides à la mitose . La non-disjonction mitotique peut produire des mosaïques somatiques.

Diagramme conceptuel

Dessinez un schème mettant en relation le plus grand nombre possible des termes suivants. Notez que ceux-ci ne sont pas présentés dans un ordre particulier.

euploïde / rapport non-balancé / non-disjonction / méiose / gamètes / stérilité / aneuploïde / rapports phénotypiques / avortement / mitose / gènes.

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Nous disposons de deux lignées de souris qui présentent deux phénotypes de comportement connus comme étant dus à deux allèles d'un seul locus : *v* entraîne chez la souris une démarche dansante tandis que *V* se caractérise par une démarche normale. Suite à un croisement entre danseurs et individus normaux, la plupart des individus F_1 sont normaux, mais, et de manière inattendue, il y a une femelle danseuse. Cette femelle F_1 a été croisée avec deux mâles danseurs différents et ne donne lieu qu'à une descendance de type danseur. Si elle est croisée à des mâles normaux, nous n'obtenons que des descendants normaux. Nous croisons trois femelles normales de sa descendance avec deux de leurs frères et ces souris donnent lieu à 60 descendants tous normaux. Cependant, lorsque l'une de ces mêmes trois femelles est croisée avec un troisième frère, nous obtenons six individus normaux et 2 danseurs dans une portée de huit souriceaux. En tenant compte des parents des F_1 danseuses, nous pouvons proposer les explications possibles suivantes à ces résultats :

a. un allèle dominant a pu être muté en un allèle récessif chez le parent normal.

b. Une mutation conduisant à un suppresseur dominant de *V* a pu se produire chez un des parents.

c. La non-disjonction à la méiose du chromosome porteur de *V* chez le parent normal a pu donner lieu à un aneuploïde viable.

d. Une délétion viable incluant *V* a pu se produire chez le méiocyte du parent normal.

Quelles explications peuvent être retenues et quelles sont celles qui sont exclues par l'analyse génétique. Expliquez votre réponse en détail.

Solution

Ce problème va nous obliger à utiliser des concepts provenant du chapitre 4 (suppression), du chapitre 7 (mutation), du chapitre 8 (délétion), et de ce chapitre (non-disjunction). La meilleure stratégie de réponse est d'envisager les explications une par une et de voir comment elles corespondent aux résultats.

a. Mutation de *V*en *v*.

Cette hypothèse exige que l'unique femelle danseuse soit homozygote *vv*. Ceci est compatible avec les résultats de son accouplement d'une part avec les mâles danseurs, ce qui - si elle est *vv* - produirait une descendance entièrement (*vv*) de danseurs, et d'autre part avec des mâles normaux, ce qui produirait uniquement des descendants *Vv* normaux. Cependant, les unions frères-soeurs au sein de cette descendance normale devrait alors produire un rapport normal : danseur de 3 :1. Comme certaines de ces unions frère-soeur ne donnent pas naissance à des danseurs, cette hypothèse n'explique pas l'ensemble de données.

b. Mutation suppresseur de *s* en *S*.

Ici les parents seraient *VVss* et *vvss*, et une mutation germinale chez l'un des deux donnerait la femelle F_1 danseuse de génotype *VvSs*. A l'union de cette F_1 avec un danseur mâle, de génotype *vvss,* nous nous attendons à obtenir quelques *Vvss* qui seraient, bien sûr, phénotypiquement normaux. Cependant, aucun type normal n'est produit par ce croisement, de telle sorte que notre hypothèse est déjà à rejeter. Une situation de linkage pourrait sauver provisoirement notre hypothèse si nous postulons que la mutation s'est produite chez le parent normal, donnant lieu à un gamète *VS*. La descendance F_1 serait *VS/vs* , et si la liaison est très marquée,

peu ou pas de gamètes *Vs* seront produits, ce qui est précisément le type qui doit se combiner au gamète *vs* provenant du mâle pour donner les souris normales *Vvss*. Cependant, si c'est le cas, le croisement avec les mâles normaux serait *VS / vs* × *Vs / Vs* et ceci nous donnerait un pourcentage élevé de descendants *VS / Vs* qui seraient de type danseur alors qu'aucun n'a été observé.

c. Non-disjonction chez le parent normal.

Ceci donnerait un gamète nullisomique qui se recombinerait avec *v* pour donner une F_1 de danseurs de génotype hémizygote *v*. Les accouplements suivants se dérouleraient comme suit :

• *v* × *vv* donne des descendants vv et v, tous de type danseur. C'est ce qui est observé.

• *v* × *VV* donne des descendants *Vv* et *V*, tous normaux. C'est ce qui est observé.

• Les croisements du premier type entre descendants normaux : *V* × *V*. Ceci nous donne *V* et *VV*, qui sont tous normaux. A nouveau, cela correspond aux donnés.

• Croisement du second type entre descendants normaux : *V* × *vv*. Ceci conduit chaque fois à 25 pour cent de *VV*, *Vv*, *V* (tous normaux) et v (danseurs). C'est ce qui est observé. Cette hypothèse correspond donc aux résultats observés.

d. Délétion de *V* chez le parent normal.

Désignons la délétion par D. La danseuse F_1 serait D*v*, et les accouplements se succéderaient comme suit :

• D*v* × vv. Ceci nous donne *vv* et D*v* qui sont tous de type danseur. C'est ce qui est observé.

• D*v* × *VV*. Ceci nous donne *Vv* et D*V*, qui sont tous normaux. C'est ce qui est observé.

• Croisements du premier type entre descendants normaux : D*V* × D*V*. Ceci nous donne D*V* et *VV*, qui sont tous normaux. C'est ce qui est observé.

• Croisements du second type entre descendants normaux : D*V* × *Vv*. Ceci conduit chaque fois à 25 pour cent de *VV*, *Vv*, D*V* (tous normaux) et D*v* (danseurs). Ceci est aussi ce qui est observé.

A nouveau donc, l'hypothèse correspond aux résultats obtenus, de sorte que nous nous trouvons en présence de deux hypothèses compatibles avec les résultats. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour nous permettre de les distinguer. Une voie évidente consisterait à examiner au microscope les chromosomes de la femelle exceptionnelle ; un type aneuploïde devrait se distinguer relativement facilement d'une délétion.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Chez une certaine plante, une controverse s'est engagée au sujet du mode d'appariement des chromosomes observé chez des autotétraploïdes obtenus par croisement de deux races géographiques. Il est établi que l'association des chromosomes se fait par paires, mais trois hypothèses ont été formulées sur la façon dont cela se produit :

a. La formation de paires se fait au hasard.

b. La formation de paires ne s'établit qu'entre chromosomes de la même race.

c. La formation de paires ne se réalise qu'entre chromosomes de races différentes.

Considérons un locus A étroitement lié à son centromère, et réalisons le croisement suivant :

Race 1 : *AAAA* × Race 2 : *aaaa*

↓

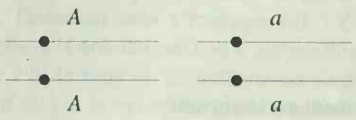
Autotétraploïde : *AAaa*

L'autotétraploïde est ensuite autofécondé. Quel sont les rapports phénotypiques attendus pour chacune des hypothèses d'appariement des chromosomes envisagées ? Expliquez votre réponse.

Solution

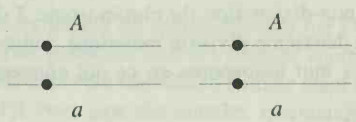
a. Dans le cas d'appariements au hasard, toutes les combinaisons sont également probables. Si nous désignons les quatre chromosomes homologues 1, 2, 3 et 4, les combinaisons également probables sont respectivement 1-2 / 3-4, 1-3 / 2-4, 1-4 / 2-3. Le cas d'un tétraploïde *AAaa* a été traité dans ce chapitre (voir page 245). Nous avons vu que les gamètes *aa* présentaient une fréquence de 1/6 et que la fréquence d'apparition d'une descendance *aaaa* devait donc être de 1/36. Tous les autres descendants possèdent au moins un allèle *A*. D'où le rapport phénotypique 35 *A* – – – : 1 *aaaa*.

b. Dans ce cas, l'appariement des paires de chromosomes se fait comme suit



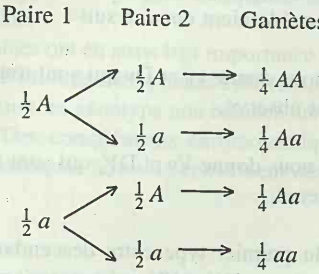
puisque les deux chromosomes *A* proviennent de la race 1 et les deux chromosomes *a* de la race 2. Ce diagramme démontre l'intérêt de procéder méthodiquement dans la recherche d'une solution à un problème, puisqu' il est clair que la seule ségrégation possible est celle d'un *A* et d'un *a* vers chaque pôle. Il s'ensuit que tous les gamètes seront du type *Aa* et, après autofertilisation, tous les génotypes seront *AAaa*. Le phénotype *A* sera le seul représenté.

c. Ici, l'appariement se présente comme suit :



BCU Lausanne - CENTRALE - CITY LIBRARY

Du fait de la ségrégation indépendante des paires, la population des gamètes peut se représenter comme suit :



L'autofécondation donne une descendance *aaaa* à la fréquence attendue de $\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{16}$. Donc, $\frac{15}{16}$ des descendants sont A – – – et un rapport phénotypique 15 : 1 est observé.

En conclusion, les trois rapports sont respectivement :

a. 35 : 1

b. 1 : 0

c. 15 : 1

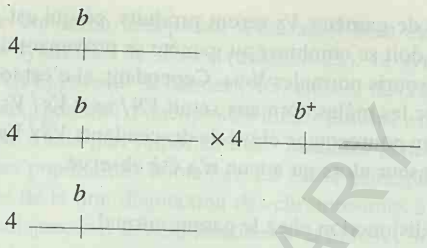
2. En raison de la taille réduite du chromosome 4 de *Drosophila,* les monosomiques et les trisomiques pour ce chromosome sont viables quoique les tétrasomiques et les nullisomiques ne le soient pas. Si une mouche trisomique pour le chromosome 4 et porteuse sur toutes les copies de ce chromosome d'un gène récessif déterminant des soies courbées (*b*) est croisée avec une mouche monosomique pour le chromosome 4 et phénotypiquement normale :

a. Quels génotypes et quels phénotypes peut-on attendre dans la descendance et dans quelles proportions ?

b. Si les trisomiques présents dans cette descendance sont croisés entre eux, quel rapport phénotypique peut-on attendre à la génération suivante ? Considérez qu'une seule copie de b^+ suffit à produire des soies normales (non courbées), que les chromosomes non appariés se distribuent vers chaque pôle au hasard, et que les gamètes aneuploïdes produits survivent.

Solution

a. Le croisement est le suivant



Les gamètes produits par le parent à soies courbées seront $\frac{1}{2}\,bb$ et $\frac{1}{2}\,b$. Ceux produits par le parent monosomique seront $\frac{1}{2}\,b^+$ et $\frac{1}{2}\,0$ (ces derniers ne comportent pas de chromosome 4). Donc, la descendance sera $\frac{1}{4}\,b^+bb$, $\frac{1}{4}\,bb$, $\frac{1}{4}\,b^+b$ et $\frac{1}{4}\,b$, ce qui entraîne un rapport phénotypique de 1 : 1.

b. Les trisomiques en cause sont de génotype b^+bb. Si nous désignons les chromosomes respectivement par 1, 2, et 3, il s'ensuit que

$$1 = b$$
$$2 = b$$
$$3 = b^+$$

et la ségrégation donne respectivement

$$1{,}2\ (bb)\ /\ 3\ (b^+)$$
$$1{,}3\ (bb^+)\ /\ 2\ (b)$$

et

$$2{,}3\ (bb^+)\ /\ 1\ (b)$$

La fécondation peut se représenter comme suit :

	$bb\,(\frac{1}{6})$	$b^+b\,(\frac{2}{6})$	$b\,(\frac{2}{6})$	$b^+\,(\frac{1}{6})$
$bb\,(\frac{1}{6})$	×	×	*bbb*	
		$\frac{2}{36}$	$\frac{2}{36}$	$\frac{1}{36}$
$b^+b\,(\frac{2}{6})$	×	×	$\frac{4}{36}$	$\frac{2}{36}$
$b\,(\frac{2}{6})$	*bbb*		*bb*	
	$\frac{2}{36}$	$\frac{4}{36}$	$\frac{4}{36}$	$\frac{2}{36}$
$b^+\,(\frac{1}{6})$	$\frac{1}{36}$	$\frac{2}{36}$	$\frac{2}{36}$	$\frac{1}{36}$

Les X représentent des tétrasomiques qui, nous le savons, ne sont pas viables. Des $\frac{27}{36}$ individus restants, $\frac{8}{36}$ sont de phénotype *b* ; on prédira donc un rapport de 19 : 8.

PROBLÈMES

1. Comment distinguez-vous les syndromes de Klinefelter, Down et Turner chez l'homme ?

2. Donnez deux façons d'établir un allotétraploïde entre deux espèces végétales apparentées, toutes deux ayant $2n = 28$.

3. a. Si la non-disjonction du chromosome 3 de *Neurospora* se produit à la deuxième division méiotique, indiquez le contenu de chacune des huit ascospores en ce qui concerne le chromosome 3.

b. *Neurospora* comporte normalement sept chromosomes. Combien de chromosomes sont représentés dans chacune des ascospores de l'asque en (a) ci-dessus ?

4. a. Comment feriez-vous la synthèse d'un pentaploïde (5*x*) ?

b. Comment obtiendriez-vous un triploïde (3*x*) de génotype *Aaa* ?

c. Vous avez réussi à obtenir une mutation récessive rare *a** chez une plante diploïde dont l'analyse mendélienne démontre

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

qu'elle est *Aa**. A partir de cette plante, comment synthétiseriez-vous un tétraploïde (4*x*) de génotype *AAa*a** ?

d. Comment obtiendriez-vous un tétraploïde de génotype *Aaaa* ?

e. Comment obtiendriez-vous une plante résistante à un herbicide chimique ? (Considérez que la mutation pour ce caractère est très rare et que vous avez de la chance si vous obtenez un mutant.)

5. Les allopolyploïdes sont : a) totalement stériles ; b) fertiles uniquement s' ils sont croisés entre eux ; c) fertiles avec l'un des deux parents seulement ; d) fertiles uniquement lorsqu'ils sont croisés avec les deux parents ; e) fertiles s'ils sont croisés entre eux et avec leurs deux parents.

6. Une levure tétraploïde peut être obtenue par fusion de deux cellules diploïdes. Ces tétraploïdes subissent la méiose comme tout tétraploïde et il en résulte quatre produits diploïdes. En supposant que les chromosomes homologues s'associent par paires au hasard et qu'aucun crossing-over ne se forme dans la région gène-centromère, quelles tétrades non-linéaires se forment chez un tétraploïde de génotype *BBbb* ? Quelle est la fréquence de ce type d'asques ? (NOTE : cette question concerne l'analyse de tétrades de cellules tétraploïdes au lieu de cellules diploïdes classiques.)

7. Chez un tétraploïde *AAaa,* aucun appariement entre chromosomes provenant du même parent n'est observé. Quel rapport phénotypique résulte-t-il d'une autofécondation ? Chez un autre tétraploïde *BBbb,* l'appariement ne se produit qu'entre chromosomes du même parent. Dans ce cas, quelle rapport phénotypique sera-t-il obtenu par autofécondation ? (Considérez dans les deux cas qu'un parent est porteur de l'allèle dominant et l'autre porteur de l'allèle récessif.)

8. Le genre *Triticum* comporte une série d'espèces polyploïdes mais aussi d'espèces diploïdes. Des croisements ont été effectués entre espèces différentes donnant lieu à des hybrides. Les figures d'appariement méiotique ont été étudiées chez chacun des hybrides : elles sont répertoriées dans le tableau suivant. (Une bivalent désigne l'appariement à la méiose de deux chromosomes homologues et un univalent un chromosome non apparié à la méiose).

Espèces impliqués dans le croisement	Figures d'appariement chez l'hybride
T. turgidum × *T. monococcum*	7 bivalents + 7 univalents
T. aestivum × *T. monococcum*	7 bivalents + 14 univalents
T. aestivum × *T. turgidum*	14 bivalents + 7 univalents

Expliquez ces résultats, et

a. déduisez le nombre de chromosomes somatiques de chaque espèce utilisée.

b. indiquez quelles espèces sont polyploïdes et si elles représentent des auto- ou des allopolyploïdes

c. rendez compte du type d'appariement chromosomique chez les trois hybrides.

9. L'espèce de cotonnier du Nouveau Monde, *Gossypium hirsutum,* possède un nombre diploïde de chromosomes de 52. Les espèces de l'Ancien Monde *G. thurberi* et *G. herbaceum* possèdent chacune 26 chromosomes (2*n*). Les hybrides interspécifiques sont caractérisés par les types d'appariement suivants à la méiose :

Hybride	Type d'appariement
G. hirsutum × *G. thurberi*	13 petits bivalents + 13 grands univalents
G. hirsutum × *G. herbaceum*	13 grands bivalents + 13 petits univalents
G. thurberi × *G. herbaceum*	13 grands univalents + 13 petits univalents

Faites un diagramme pour rendre compte de ces observations d'un point de vue phylogénétique en indiquant clairement les relations entre les espèces. Comment procéderiez-vous pour démontrer la justesse de votre interprétation ?

(Le problème 9 est extrait de A.M. Srb, R.D. Owen, et R.S. Edgar, *General Genetics,* 2ième éd. W.H. Freeman and Company., 1965)

10. Un autotétraploïde est héterozygote pour deux gènes *FFff* et *GGgg.* Chaque locus affecte un caractère différent, est situé sur un jeu différent de chromosomes homologues et est très proche du centromère.

a. De quels génotypes seront les gamètes produits par cet individu, et dans quelles proportions ?

b. Si cet individu est autofécondé, quelle proportion de la descendance aura-t-elle le génotype *FFFf GGgg* ? Et le génotype *ffff gggg* ?

11. Laquelle des anomalies suivantes n'est-elle pas due à une non-disjonction au cours de la méiose ? a) Syndrome de Turner ; b) syndrome du cri du chat ; c) syndrome de Down d) syndrome de Klinefelter ; e) syndrome XYY ; f) nanisme achondroplastique g) syndrome d'Edwards ; h) syndrome de Marfan.

12. Une patiente souffrant du syndrome de Turner est aussi atteinte de daltonisme. Son père, comme sa mère, possède une vision normale. Comment cela s'explique-t-il ? Cette situation nous indique-t-elle si la non-disjonction s'est produite chez le père ou chez la mère ? Si le gène du daltonisme est situé près du centromère (ce qui n'est pas le cas en fait), les données cliniques nous seraient-elles utiles pour savoir si la non-disjonction s'est produite à la première ou à la seconde division méiotique ? Répondez aux mêmes questions dans le cas d'un patient souffrant de daltonisme et du syndrome de Klinefelter.

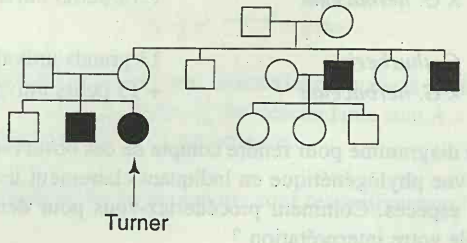
13. Certains individus sont atteints de daltonisme pour un oeil mais pas pour l'autre. Que ceci suggère-t-il si ces individus étaient : a) seulement ou surtout des femmes ? b) seulement ou surtout des hommes ? (Supposez qu'il s'agit d'un caractère lié au chromosome X.)

14. Suite à un traitement du sperme humain par l'hydrochlorure de quinacrine, la moitié environ des cellules spermatiques présente une tache fluorescente considérée comme étant le chromosome Y. Environ 1,2 pour cent des cellules spermatiques montrent

ECUMENICAL CULTURAL UNIVERSITY LIBRARY

quant à elles deux taches fluorescentes. Le sperme de certains ouvriers qui ont été exposés pendant une année à l'agent chimique dibromochloropropane a été examiné et la fréquence de cellules à deux taches était en moyenne de 3,8 pour cent. Proposez une explication de ce résultat et expliquez comment vous la testeriez.

15. Un individu souffrant du syndrome de Turner présente aussi le phénotype du nystagmus (une anomalie de l'oeil).



a. Quel(s) évènement(s) peut ou peuvent expliquer la coïncidence de la présence de ces deux anomalies héréditaires.

b. Chez quel parent et à quel stade se manifeste ou se manifestèrent le ou les évènements responsables de ces anomalies ?

16. En Colombie Britannique, la moyenne d'âge des mères de bébés présentant le syndrome de Down a diminué de 34 à 28 ans entre 1952 et 1972. Quels sont les causes possibles de cette tendance au sein de la population, et comment pourrait-on tester les hypothèses relatives à ce sujet ?

17. Des études relativement bien documentées existent pour plusieurs cas de mosaïques sexuelles chez l'homme. Suggérez quelle pourrait être l'origine des exemples suivants :

a. XX / XO (ce qui signifie qu'il y a deux types de cellules dans l'organisme, XX et XO).

b. XX / XXYY. **c.** XO / XXX.

d. XX / XY. **e.** XO / XX / XXX.

18. La découverte des profils de bandes chez les chromosomes eucaryotiques a amélioré considérablement l'identification de divers événements cytologiques. L'existence d'un polymorphisme de ces profils de bandes s'est avérée particulièrement utile, puisque ces isomorphes peuvent être utilisés comme marqueurs morphologiques. (Ces isomorfes sont en fait des chromosomes que l'on peut distinguer cytologiquement du fait de variations mineures dans la taille, la position ou d'autres caractéristiques des bandes). Considérons le cas du chromosome 21 chez l'homme et disons qu'une catégorie de parents sont 21^a21^b ♀ × 21^c21^d ♂ où a, b, c et d représentent des isomorphes de chromosome. Supposons que des foetus des types suivants (42 A représente l'ensemble du reste des autosomes) soient produits :

(1) $42A + 21^b21^b21^c + XY$
(2) $42A + 21^a21^b21^d + XX$
(3) $42A + 21^b21^d + XY$
(4) $42A + 21^a21^c21^c + XX$
(5) $42A + 21^a21^b + XY$
(6) $42A + 21^a21^c + XYY$
(7) $(42A + 21^a + XY)(42A + 21^a21^b21^b + XY)$ (mosaïque)
(8) $(42A + 21^a21^c + XY)(42A + 21^b21^d + XX)$ (mosaïque)

Dans chaque cas :

a. Donnez le terme génétique désignant la condition correspondante.

b. Etablissez le diagramme des événements qui sont à la base de cette condition.

c. Indiquez chez quel individu les événements ont eu lieu.

19. Une lignée de souris se caractérise par des formes cytologiquement répérables du chromosome 4. Son extrémité peut porter un renflement (4^K), ou un satellite (4^S) ou ni l'un ni l'autre (4). Ces trois dessins schématisent les trois types :

Vous croisez une femelle 4^K4^S avec un mâle 44, et vous vous apercevez que la plupart des descendants sont 4K4 ou 4S4, comme vous vous y attendiez. Cependant, on trouve parfois les quelques types rares suivants (tous les autres chromosomes sont normaux) :

a. 4^K4^K4 **b.** 4^K4^S4 **c.** 4^K

d. 4 / 4^K4^K4 mosaïque **e.** 4^K4 / 4^S4 mosaïque

Expliquez l'origine de ces types rares. Donnez les stades auxquels ils se sont produits et établissez s'ils sont apparus chez le parent mâle, le parent femelle, ou le zygote. (Donnez-en succintement les raisons.)

20. Chez *Drosophila* un croisement (désigné croisement 1) a été réalisé entre deux mutants, l'un homozygote pour la mutation recessive "aile courbe" (*b*) et l'autre homozygote pour la mutation récessive "yeux atrophiés" (*e*) . Ces mutations *b* et *e* représentent des allèles de deux gènes distincts étroitement liés sur le minuscule chromosome 4. Tous les descendants sont de type sauvage. L'une des mouches femelles de cette descendance a été croisée à un mâle de génotype bbee (croisement 2). La descendance de ce croisement 2 comportait pour la plupart les types attendus, sauf qu'un femelle de type sauvage était aussi représentée.

a. Expliquez ce qu'on s'attend à obtenir comme descendance du croisement 2.

b. Le rare type femelle sauvage pourrait-il être dû à

(1) Un crossing-over

(2) Une non-disjonction

Expliquez.

c. Ce génotype femelle sauvage a été impliqué dans un croisement-test avec un mâle de génotype *bbcc* (croisement 3). Les descendants étaient respectivement du type :

sauvage ;
aile courbe, oeil atrophié ;
aile courbe ;
oeil atrophié.

Quelles explications fournies en b sont compatibles avec ces résultats ? Donnez les génotypes et phénotypes des descendants du croisement 3 et leurs proportions relatives.

Décomposons le problème :

a. Définissez homozygote, mutation, allèle, gènes étroitement liés, récessif, type sauvage, crossing-over, non-disjonction.

b. Ce problème implique-t-il une liaison au sexe ? Expliquez.

c. Quel est le nombre de chromosomes de Drosophila ?

d. Dressez un pédigré résumant les résultats des croisements 1, 2 et 3.

e. Représentez les gamètes produits par les deux parents du croisement 1.

f. Représentez la constitution du chromosome 4 de la descendance du croisement 1.

g. Est-il surprenant que la descendance du croisement 1 soit de type sauvage ? Que vous indique ce résultat ?

h. Représentez la constitution du chromosome 4 du mâle utilisé comme parent dans le croisement 2, ainsi que les gamètes qu'il produit.

i. En considérant le chromosome 4, quels gamètes peuvent être produits par le parent femelle du croisement 2 en l'absence de non-disjonction ? Quels sont ceux qui seraient respectivement les plus fréquents et les plus rares.

j. Dessinez la première et la seconde division méiotique en non-disjonction chez le parent femelle du croisement ainsi que les gamètes qui en résultent.

k. Certains des gamètes de la question j sont-ils aneuploïdes ?

l. Vous attendez-vous à ce que les gamètes aneuploïdes donnent lieu à une descendance viable ? Ces descendants seraient-ils nullisomiques, monosomiques, disomiques, ou trisomiques ?

m. Quels seraient les phénotypes des descendants issus de la gamme des gamètes envisagés aux points i et j ?

n. De nombreux rapports génétiques s'expriment en moitié ou en quart, alors que le rapport entre phénotypes dans la descendance du croisement 3 se base sur des tiers et des sixièmes. Que cela pourrait-il indiquer?

o. Le fait que les croisements concernent des gènes situés sur un très petit chromosome pourrait-il avoir une signification ? Quand la taille d'un chromosome est-elle importante en génétique ?

p. Représentez la descendance attendue dans le cas du croisement 3 en utilisant les deux hypothèses et donnez-en les proportions relatives.

21. Chez la tomate, on réalise un croisement entre une plante femelle trisomique pour le chromosome 6 et une plante mâle diploïde normale homozygote pour l'allèle récessif *pp* (feuilles en forme de feuilles de pomme de terre).

a. Une plante trisomique F_1 est recroisée avec le mâle à feuilles de pomme de terre. Quel est le rapport entre des plantes à feuilles normales et plantes à feuilles de pomme de terre si vous supposez que *p* est situé sur le chromosome 6.

b. Quel est le rapport entre plantes à feuilles normales et plantes à feuilles de pomme de terre si *p* n'est pas situé sur le chromosome 6.

22. Chez la tomate, une tentative a été faite d'assigner cinq gènes récessifs à des chromosomes spécifiques en utilisant des trisomiques. Chaque mutant homozygote (2*n*) a été croisé aux trois trisomiques, respectivement pour les chromosomes 1, 7 et 10. Une descendance trisomique (moins vigoureuse) fut sélectionnée à partir de ces croisements et rétrocroisée avec les homozygotes récessifs concernés et la descendance *diploïde* de ces croisements fut étudiée. Les résultats, sous forme de rapports type sauvage : mutant sont les suivants :

Chromosome trisomique	Gène				
	d	*y*	*c*	*h*	*cot*
1	48 : 55	72 : 29	56 : 50	53 : 54	32 : 28
7	52 : 56	52 : 48	52 : 51	58 : 56	81 : 40
10	45 : 42	36 : 33	28 : 32	96 : 50	20 : 17

Quels gènes peuvent être localisés et sur quel chromosome ? (Expliquez votre réponse in extenso.)

23. Chez une plante de *Petunia*, les gènes *A*, *B*, *C* et *D* sont étroitement liés. Une plante de génotype *a B c D*/*A b C d* est irradiée aux rayons gamma et croisée avec *aa bb cc dd*. Dans la descendance, des plantes de phénotype *A-B-C-D*-ne sont pas rares. Quelles sont leurs deux origines possibles et quelle est la plus probable ?

24. Chez *Neurospora*, un croisement entre individus à chromosome à marqueurs multiples ab^+cd^+e et $a^+bc^+de^+$ fournit un produit de la méiose qui pousse sur milieu minimum (supposez que *a*, *b*, *c*, *d* et *e* sont des marqueurs nutritionnels). Lorsque l'unique colonie se développe, quelques spores *asexuées* sont génotypiquement ab^+cd^+e, certaines $a^+bc^+de^+$, et le solde pousse sur milieu minimum. Expliquez l'origine de ce produit rare de la méiose ainsi que celle des trois types de spores asexuées.

BCU LAUSANNE CENTRALE UNIVERSITÄTSBIBLIOTHEK

25. Chez *Neurospora,* on croise deux auxotrophes : *pan1* × *leu2*. Ces loci sont liés sur le même bras de chromosome, *leu 2* étant situé entre le centromère et *pan1*. La plupart des octades produites sont du type attendu, mais les types non-classiques suivants ont été aussi dénombrés :

a.	**b.**
prototrophe	exigence en panthoténate
prototrophe	exigence en panthoténate
prototrophe	type avorté
prototrophe	type avorté
type avorté	exigence en leucine
type avorté	exigence en leucine
type avorté	exigence en leucine
type avorté	exigence en leucine

c.
prototrophe
prototrophe
type avorté
type avorté
exigence en leucine
exigence en leucine
exigence en panthoténate
exigence en panthoténate

Expliquez l'origine de ces trois types.

26. Chez *Sordaria brevicollis* (un ascomycète), les mutations b_1 et b_2 représentent des marqueurs, étroitement liés complémentant entre eux, donnant lieu à des ascospores de couleur chamois (brun clair). Dans le croisement $b_1 \times b_2$, si l'un ou les deux centromères se divisent et se séparent de façon précoce à la première division méiotique, quels seront les distributions des couleurs des spores au sein des asques produits ? Comment pouvez-vous distinguer ces asques d'asques normaux et d'asques présentant une non-disjonction ? (NOTE : les ascospores chez ce champignon sont normalement noires et les ascospores hypoploïdes sont blanches ; supposez qu'il ne se produise pas de crossing-over entre b_1 et b_2.)

27. Elaborez un système-test permettant de détecter dans l'environnement des agents susceptibles de causer l'aneuploïdie chez les eucaryotes.

28. Deux allèles déterminent la couleur des fleurs chez *Datura : P* donne des fleurs pourpres, et *p*, des fleurs blanches. Le locus *P* est situé sur le plus petit des chromosomes (chromosome 3). Chez des trisomiques pour ce chromosome, le pollen n + 1 n'est jamais fonctionnel, et seulement la 1/2 des ovules sont fonctionnels. Considérons que P est complètement dominant quelque soit le nombre de p, et que le locus est situé près du centromère. Quel est le rapport fleurs pourpres : fleurs blanches attendu dans la descendance des croisements suivants ?

a. *PPp* ♀ × *PPp* ♂

b. *Ppp* ♀ × *Ppp* ♂

c. *Ppp* ♀ × *pp* ♂

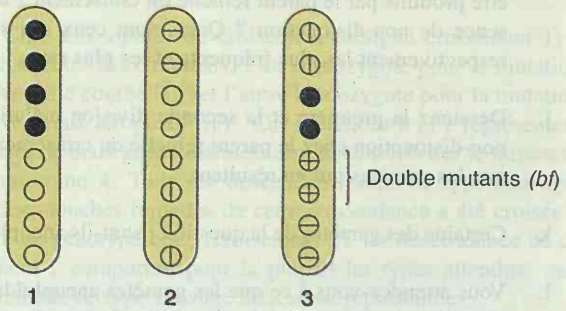
29. Le genre *Brassica* comporte six espèces majeures : *B. carinata, B. campestris, B. nigra, B. oleracea, B. juncea, B. napus.* Vous pouvez déduire les relations existant entre ces six espèces à partir du tableau suivant :

Espèce ou hybride F_1	Nombre de chromosomes	Nombre de bivalents	Nombre d'univalents
B. juncea	36	18	0
B. carinata	34	17	0
B. napus	38	19	0
B. juncea × *B. nigra*	26	8	10
B. napus × *B. campestris*	29	10	9
B. carinata × *B. oleracea*	26	9	8
B. juncea × *B. oleracea*	27	0	27
B. carinata × *B. campestris*	27	0	27
B. napus × *B. nigra*	27	0	27

a. Déduisez le nombre de chromosomes de *B. campestris*, *B. nigra* et *B.oleracea.*

b. Montrez clairement les relations phylogénétiques existant entre les six espèces à partir de la composition chromosomique.

30. Chez *Ascobolus* (champignon semblable à *Neurospora*), les ascospores sont normalement noires. La mutation f qui donne lieu à des ascospores de couleur fauve concerne un gène situé juste à la droite du centromère sur le chromosome 6, tandis que la mutation b, responsable de la formation d'ascospores beiges touche un gène juste à la gauche du même centromère. Dans un croisement entre parents fauve et beige (+ *f* × *b* +), la plupart des octades exceptionelles furent détectées et figurées ci-dessous. Dans le schéma, le noir désigne le phénotype sauvage ; une lignée verticale le phénotype fauve, une horizontale le beige et un cercle vide représente une ascospore avortée.



a. Donnez des explications plausibles sur l'origine de ces trois octades exceptionelles.

b. Etablissez le diagramme de la méiose donnant lieu à l'octade 2.

DCU BOOLEAN UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

10

La recombinaison chez les bactéries et leurs virus

Colonies de bactéries sur un milieu spécialisé. Les colonies d'*Escherichia coli* montrées ici ont poussé sur le milieu de MacConkey qui colore les cellules Lac^+ en rouge. Les cellules Lac^- sont blanches. Chaque colonie provient de la multiplication d'une cellule isolée et contient environ 10 millions de cellules. (Jeffrey Miller).

CONCEPTS-CLÉS

- Le facteur de fertilité (F) permet le transfert d'ADN par conjugaison entre cellules bactériennes.
- F peut se maintenir dans le cytoplasme ou s'intégrer dans le chromosome bactérien.
- L'intégration de F dans le chromosome permet le transfert de marqueurs chromosomiques lors de la conjugaison.
- Les bactériophages peuvent aussi transférer de l'ADN bactérien d'une cellule à une autre
- Lors de la transduction généralisée, divers segments quelconques du chromosome provenant de sa fragmentation sont encapsidés dans la tête de certains virus bactériens (bactériophages) et transportés par infection dans d'autres cellules bactériennes.
- Lors de la transduction spécialisée, des gènes déterminés situés près du locus d'insertion du chromosome phagique dans le chromosome bactérien sont incorporés «par erreur» dans le génome phagique et transportés par infection dans d'autres cellules bactériennes.
- L'exploitation des différents modes de transfert de gènes entre bactéries permet aux généticiens d'établir des cartes détaillées du chromosome bactérien et de ses gènes.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Jusqu'à présent, nous nous sommes occupés exclusivement de gènes situés sur des chromosomes contenus dans les noyaux d'organismes eucaryotiques. Cependant, une part considérable de l'histoire de la Génétique ainsi que de l'analyse génétique contemporaine (en particulier, la génétique moléculaire) a trait aux organismes procaryotiques, qui n'ont pas de noyau distinct, et aux virus. Bien que les virus présentent certaines des propriétés caractéristiques d'organismes vivants, de nombreux biologistes les considèrent comme des entités distinctes, qui ne sont pas à proprement parler des êtres vivants. Ce ne sont pas des cellules et ils ne peuvent ni croître ni se multiplier par eux-mêmes. Pour se reproduire, ils doivent parasiter des cellules vivantes et se servir de l'appareil métabolique de celles-ci. Néanmoins, les virus possèdent des propriétés héréditaires accessibles à l'analyse génétique. L'analyse génétique des bactéries et de leurs virus a livré des informations capitales quant à la nature et à la structure du matériel génétique, a permis de déchiffrer le code génétique et de comprendre la nature des mutations. Comparés aux eucaryotes, les procaryotes et les virus ont des chromosomes très simples qui ne sont pas enveloppés dans une membrane nucléaire. A la différence des eucaryotes, les organismes procaryotes et les virus ont des chromosomes simples qui ne sont pas contenus dans une membrane nucléaire. Comme les procaryotes sont monoploïdes, ces chromosomes ne subissent pas de méiose, mais ils passent par des stades qui rappellent ceux de la méiose. L'analyse génétique par recombinaison chez ces organismes ressemble très fort à celle utilisée pour les eucaryotes. Bien que nous les abordions dans des chapitres distincts, les deux systèmes ne présentent guère de différences fondamentales.

Les **procaryotes** comprennent les algues bleues que l'on dénomme à présent «cyanobactéries» et les bactéries. Les virus bactériens — qui parasitent les bactéries — sont les mieux étudiés à ce jour. On les appelle **bactériophages** ou simplement **phages**. Les travaux sur les bactériophages ont ouvert la voie à une grande partie de la recherche récente sur les virus oncogènes et sur d'autres virus d'animaux et de plantes qui commencent à être mieux compris au niveau génétique.

Plusieurs occasions de recombinaison génétique se présentent chez les bactéries, et ce chapitre les passe en revue. Dans le premier phénomène que nous aborderons, la **conjugaison**, une cellule bactérienne transfère de l'ADN dans une autre avec laquelle elle est en contact immédiat. Une cellule bactérienne peut aussi puiser un fragment d'ADN dans le milieu environnant et l'incorporer dans son chromosome. Ce processus est appelé **transformation**. Enfin, certains virus bactériens peuvent emporter un morceau de l'ADN d'une bactérie et l'injecter dans une autre où cet ADN peut être intégré dans le chromosome. Ce phénomène est connu sous le nom de **transduction**.

La manipulation des microorganismes

Comment le généticien peut-il étudier la transmission héréditaire chez des organismes qu'on ne peut voir que sous le microscope ? On peut cultiver les bactéries en milieu liquide ou sur une surface solide tel un gel d'agar, à condition de leur fournir des éléments nutritifs de base. En milieu liquide, les bactéries se divisent par fission binaire : elles se multiplient géométriquement jusqu'à ce que les produits nutritifs soient épuisés ou que des produits toxiques (déchets) s'accumulent jusqu'à atteindre une concentration qui provoque l'arrêt de la croissance. Si l'on prélève au moyen d'une pipette un échantillon d'une culture liquide et qu'on le répartit régulièrement, au moyen

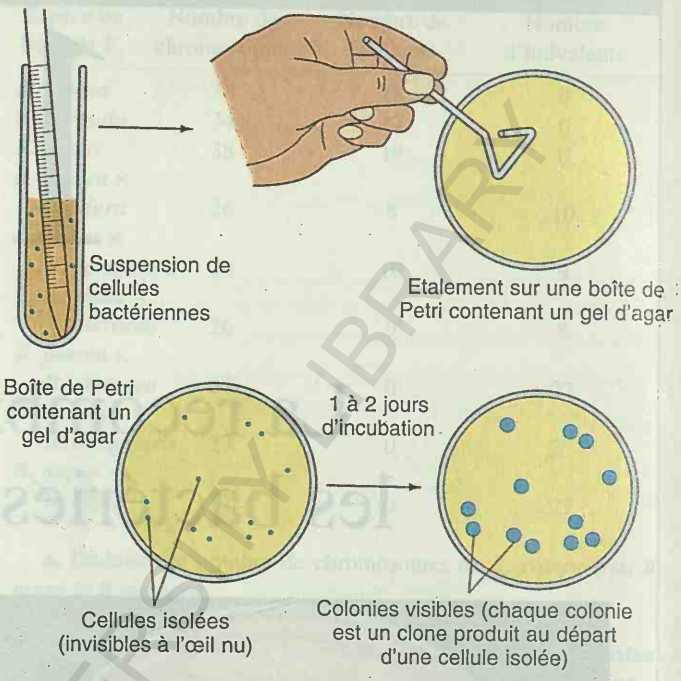


Figure 10-1. Culture de bactéries au laboratoire. Un petit nombre de cellules bactériennes qui ont été cultivées dans un milieu liquide contenant des substances nutritives appropriées sont étalées sur un milieu solide contenant les mêmes nutriments. Chacune de ces cellules va se diviser par fission binaire et de nombreuses divisions successives vont donner naissance à une colonie. Toutes les cellules d'une colonie sont issues d'une seule cellule originale et ont donc le même génotype et le même phénotype.

d'un étaloir stérilisé, sur la surface d'une boîte de Petri contenant un milieu gélosé, les cellules vont s'y reproduire par fission. Comme elles sont immobilisées sur le gel d'agar, toutes les cellules filles vont rester groupées et constituer un amas. Quand cet amas dépasse les 10^7 cellules, il devient visible à l'œil nu sous forme d'une colonie. La manipulation qui vient d'être décrite est appelée **étalement** (figure 10-1). Si l'échantillon étalé ne contient qu'un très petit nombre de cellules, chaque colonie isolée sur la boîte sera issue d'une seule cellule originelle. Les individus au sein d'une colonie descendent tous d'un ancêtre génétique commun et sont appelés **clones**.

Comme nous l'avons vu au chapitre 7, les bactéries de type sauvage sont **prototrophes :** elles peuvent former des colonies sur un **milieu minimum** – un substrat qui ne contient que des sels inorganiques, une source de carbone et d'énergie et de l'eau. Les clones mutants peuvent être identifiés parce qu'ils sont **auxotrophes** : ils ne poussent pas si le milieu ne contient pas un ou plusieurs nutriments spécifiques, par exemple, de l'adénine ou de la thréonine et de la biotine. De plus, les organismes de type sauvage sont sensibles à certains antibiotiques tels que la streptomycine, tandis que des **mutants résistants** peuvent former des colonies malgré la présence de ces substances inhibitrices. Ces propriétés permettent au généticien de distinguer différents phénotypes parmi les colonies présentes sur une boîte de Petri.

Il est possible de déterminer le phénotype de nombreux traits directement par inspection visuelle des colonies ou par quelque test chimique simple. Le phénotype en question peut alors être

Tableau 10-1. Symboles de génotypes bactériens

Symbole	Caractère ou phénotype correspondant au symbole
bio$^-$	Exige l'addition de biotine au milieu minimum.
arg$^-$	Exige l'addition d'arginine au milieu minimum.
met$^-$	Exige l'addition de méthionine au milieu minimum.
lac$^-$	Incapable d'utiliser le lactose comme source de carbone.
gal$^-$	Incapable d'utiliser le galactose comme source de carbone.
str^r	Résistant à l'antibiotique streptomycine.
str^s	Sensible à l'antibiotique streptomycine.

NOTE : Le milieu minimum est le milieu synthétique de base utilisé pour la culture des bactéries, sans suppléments nutritifs.

attribué à la cellule originelle du clone et les fréquences des différents phénotypes dans l'échantillon pipeté peuvent être établies. Quelques exemples de phénotypes et les symboles des génotypes correspondants sont présentés dans le tableau 10-1. Reportez-vous au chapitre 7 pour la description d'autres techniques de génétique microbienne.

La conjugaison bactérienne

Les sections suivantes relatent la découverte du transfert de gènes entre bactéries, décrivent les différents modes de transfert et leur utilisation en génétique bactérienne. Nous traiterons d'abord de la **conjugaison**, un phénomène par lequel certaines cellules bactériennes transfèrent de l'ADN dans d'autres cellules avec lesquelles elles entrent en contact. Avant tout aperçu historique, résumons ce que l'on sait aujourd'hui de la conjugaison chez *E. coli*.

Les propriétés remarquables du facteur F

La faculté de transférer de l'ADN par conjugaison dépend de la présence dans le cytoplasme d'une entité appelée **facteur F** ou **facteur de fertilité**. Les cellules porteuses de F sont appelées **F$^+$** ; les cellules dépourvues de F sont appelées **F$^-$**. Le facteur F est une petite molécule circulaire d'ADN qui contient environ 100 gènes, lesquels confèrent à F plusieurs propriétés importantes :

1. F réplique son ADN de façon autonome, ce qui lui permet de se perpétuer au cours de divisions cellulaires successives (figure 10-2a).
2. Les cellules contenant F produisent des **pili** (au singulier, pilus), de minuscules tubules constitués de protéines, qui permettent aux cellules porteuses de F de s'attacher de manière durable à d'autres cellules (figure 10-2b).
3. Les cellules F$^+$ peuvent transférer une copie nouvellement synthétisée du facteur F vers une cellule réceptrice (F$^-$) qui ne contient pas ce facteur (figure 10-2c). Observez qu'une copie de F reste présente dans la cellule «donneuse» et que la cellule réceptrice devient F$^+$ elle aussi.
4. Le contact entre cellules F$^+$ est généralement inhibé.
5. F s'intègre parfois par recombinaison dans le chromosome de l'hôte bactérien (figure 10-2d). Dans ce cas, F transférera également des marqueurs chromosomiques de l'hôte ; en effet, F transfère tout ADN qui lui est attaché (figure 10-3a). Quand cela se produit, F peut diriger le transfert de marqueurs chromosomiques de l'hôte en même temps que celui de son propre ADN (figure 10-3b).

Ce transfert de marqueurs chromosomiques liés à F a plusieurs conséquences importantes. Précisons d'abord que F ne s'intègre dans le chromosome que dans une petite fraction de la population de cellules qui le contiennent (figure 10-3c). Ces quelques cellules sont à présent capables de transférer des marqueurs chromoso-

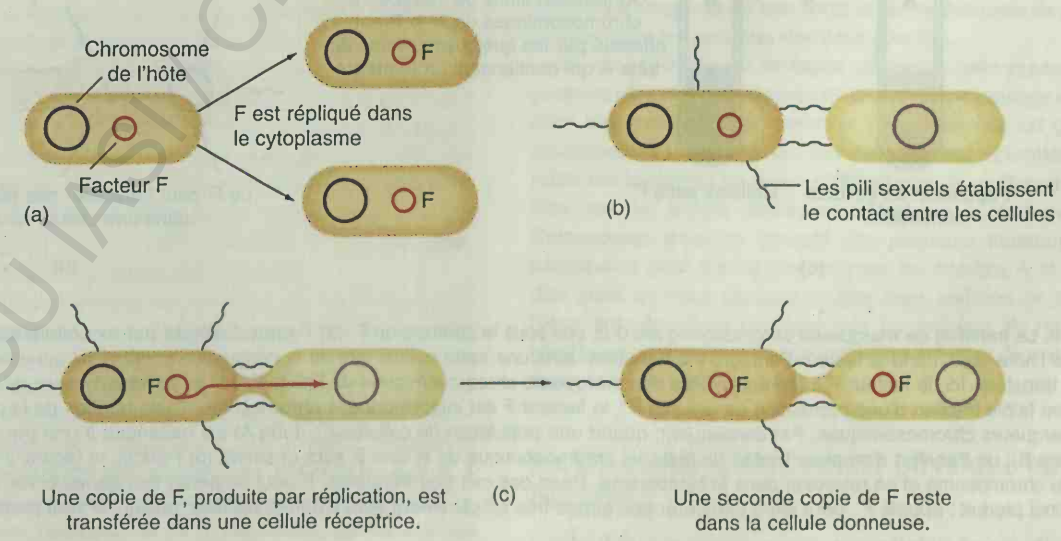


Figure 10-2. Quelques-unes des propriétés du facteur de fertilité (F) d'*E. coli*.

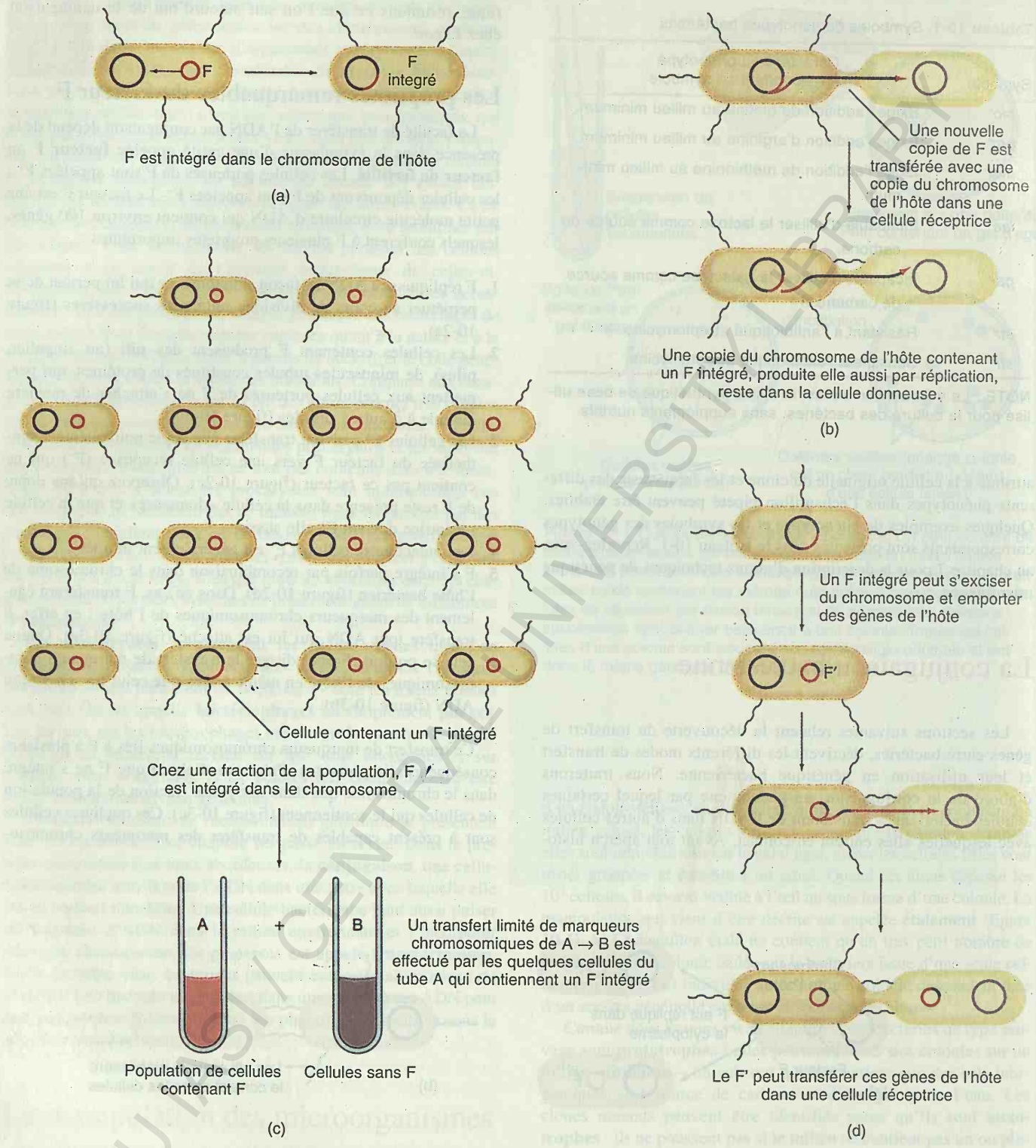


Figure 10-3. Le transfert de marqueurs chromosomiques d'*E. coli* sous le contrôle de F. (a) F peut s'intégrer par recombinaison dans le chromosome de l'hôte. (b) Quand le facteur F intégré est transféré dans une autre cellule lors de la conjugaison, tout ADN qui y est attaché est également transféré. Ici, le facteur F intégré transfère des marqueurs chromosomiques de l'hôte *E. coli* au fur et à mesure de leur réplication. (c) Chez une faible fraction d'une population de cellules F^+, le facteur F est intégré dans le chromosome. Cette fraction de la population transfère des marqueurs chromosomiques. Par conséquent, quand une population de cellules F^+ (tube A) est mélangée à une population de cellules F^- (tube B), un transfert d'ampleur limitée de matériel chromosomique de A vers B sera observé. (d) Parfois, le facteur F intégré peut s'exciser du chromosome et se retrouver dans le cytoplasme. Dans des cas peu fréquents, F peut emporter des gènes chromosomiques. Le facteur F ainsi produit , appelé F', peut alors transférer ces gènes très efficacement vers d'autres cellules, puisqu'ils sont partie intégrante de son ADN.

miques vers des cellules d'une autre souche. Bien que le taux de transfert soit très faible, il est néanmoins détectable parce que les marqueurs chromosomiques transférés produisent des recombinants dans la seconde souche. C'est ce phénomène qui a permis de découvrir le phénomène de transfert de gènes par conjugaison.

Il est possible d'isoler les cellules qui contiennent le facteur F intégré dans leur chromosome à partir d'une population de F^+ et de cultiver des souches pures de ces cellules. Chaque cellule de ces souches transfère des marqueurs chromosomiques, de sorte que la fréquence d'apparition de recombinants qu'elles produisent par conjugaison est beaucoup plus élevée que celle observée avec la population F^+ originale chez laquelle le facteur F est presque toujours dans le cytoplasme. Pour cette raison, les souches qui contiennent un facteur F intégré dans le chromosome sont appelées souches à **haute fréquence de recombinaison** ou **Hfr**, ce qui les distingue des souches F^+ qui ne contiennent que quelques cellules Hfr capables de transférer des marqueurs chromosmiques, ce qui explique la faible fréquence de recombinaison observée avec de telles souches. Le transfert de marqueurs chromosomiques par les souches Hfr est très utile pour la cartographie génétique, comme nous le verrons plus loin.

Il arrive que F s'excise du chromosome d'une cellule Hfr et parfois, il emmène avec lui quelques gènes chromosomiques. Ce facteur F modifié, appelé **F'**, peut désormais transférer ces gènes de l'hôte de façon spécifique dans une cellule réceptrice. Après ce transfert, la cellule réceptrice contient donc deux exemplaires de ces gènes, l'un sur le chromosome et l'autre sur le facteur F' présent dans le cytoplasme.

Voyons à présent comment ces phénomènes ont été découverts par les pionniers de la génétique bactérienne.

La découverte du transfert de gènes entre bactéries

Les bactéries sont - elles douées de propriétés telles que la sexualité ou la recombinaison? La réponse à cette question fut apportée par une expérience à la fois simple et élégante, réalisée en 1946 par Joshua Lederberg et Edward Tatum. Ils utilisèrent deux souches de *E. coli* présentant des exigences nutritionnelles différentes. La souche A ne pouvait croître sur un milieu minimum que si l'on y ajoutait de la méthionine et de la biotine ; la souche B ne croissait sur mileu minimum que si on y additionnait de la thréonine, de la leucine et de la thiamine. Nous pouvons donc décrire la souche A comme étant *met⁻ bio⁻ thr⁺ leu⁺ thi⁺* et la souche B comme *met⁺ bio⁺ thr⁻ leu⁻ thi⁻*. Nous anticipons quelque peu en utilisant des symboles de gènes pour décrire ces phénotypes parce qu'il n'avait pas encore été prouvé à l'époque qu'ils fussent chacun déterminés par un seul gène. Nous nous servons de ce symbolisme pour nous faciliter la tâche. Notez également que le fait d'écrire les symboles dans un ordre déterminé n'implique nullement qu'ils soient liés ni arrangés dans cet ordre.

Lederberg et Tatum étalèrent des bactéries sur des boîtes contenant du milieu minimum sans supplément nutritionnel. Ils étalèrent soit des bactéries de la souche A ou de la souche B, soit un mélange de bactéries des deux souches qui avaient été incubées ensemble pendant plusieurs heures dans un milieu liquide contenant tous les suppléments (figure 10-4). Des colonies apparurent sur les boîtes ensemencées avec un mélange de bactéries A et B, à la fréquence d'une par 10.000.000 de cellules étalées (les scientifiques parlent d'une fréquence de 10^{-7}). Par contre, aucune colonie n'apparut sur les boîtes ensemencées avec des bactéries A ou B.

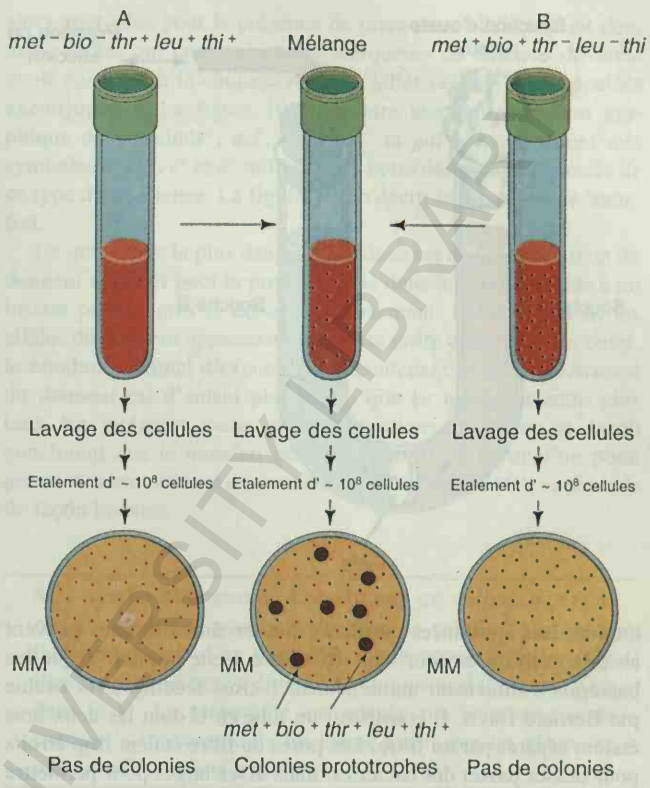


Figure 10-4. Démonstration par Lederberg et Tatum de la recombinaison génétique entre cellules bactériennes. Les cellules du type A ou B ne peuvent croître sur un milieu sans suppléments nutritionnels (milieu minimum, MM) parce qu'elles portent des mutations qui les empêchent de synthétiser certaines substances indispensables à la croissance. Toutefois, quand on mélange A et B pendant quelques heures avant de les étaler, quelques colonies apparaissent sur le milieu gélosé. Ces colonies sont issues de cellules isolées qui, à la suite d'un échange génétique, sont devenues capables de synthétiser tous les métabolites nécessaires à la croissance.

Comme seules des bactéries prototrophes *met⁺ bio⁺ thr⁺ leu⁺ thi⁺* étaient capables de croître sur milieu minimum sans supplément, ce résultat suggérait qu'une sorte de recombinaison de gènes avait eu lieu entre les génomes des deux souches.

Si vous réfléchissez de façon critique à cette expérience, vous pourriez objecter : «Mais ces colonies de type sauvage ne peuvent-elles être produites par mutation ?» La réponse est que si elles résultaient de mutations, des colonies auraient également dû apparaître sur les boîtes ou *seules* des bactéries A ou B avaient été étalées sur le milieu minimum. Mais ce n'était pas le cas. Remarquons aussi en passant que plusieurs mutations seraient nécessaires pour rendre prototrophes les souches A et B, c'est-à-dire pour qu'elles puissent croître sans addition de nutriments. Nous pouvons donc conclure que les colonies de type sauvage résultaient plus que probablement d'un échange de matériel génétique entre les deux souches.

La nécessité d'un contact physique entre bactéries

On pourrait imaginer que les cellules de ces deux souches n'échangent pas réellement des gènes, mais qu'elles sécrètent plu-

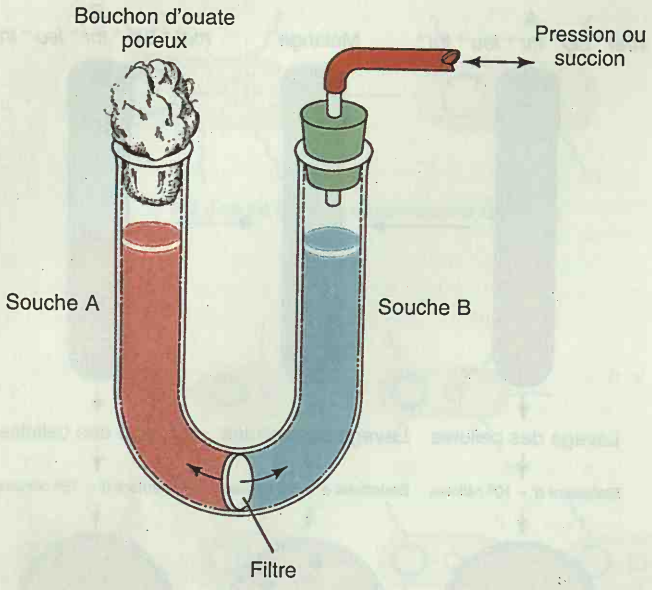


Figure 10-5. Démonstration expérimentale de la nécessité d'un contact physique entre bactéries pour que la recombinaison génétique se produise. Une suspension d'une souche bactérienne incapable de croître sur un milieu sans suppléments nutritionnels est introduite dans une branche du tube en U. Une suspension d'une souche incapable de synthétiser d'autres métabolites essentiels est introduite dans l'autre branche. Le liquide peut passer d'une branche à l'autre si l'on applique une pression ou une succion, mais les bactéries ne peuvent traverser le filtre séparant les deux branches. Après plusieurs heures d'incubation, les cellules sont étalées. Aucune colonie n'apparaît sur le milieu minimum sans suppléments.

tôt certaines substances nutritives que les autres cellules peuvent absorber et utiliser pour leur croissance. Cette possibilité que les bactéries s'alimentent mutuellement («cross-feeding») fut exclue par Bernard Davis. Il construisit un tube en U dont les deux bras étaient séparés par un filtre. Les pores du filtre étaient trop étroits pour laisser passer des bactéries, mais assez larges pour permettre le passage du milieu et de substances qui y seraient dissoutes (figure 10-5). Une culture de la souche A fut introduite dans un bras ; une culture de la souche B dans l'autre. Après une période d'incubation, Davis testa les cellules contenues dans chaque bras du tube pour voir si certaines d'entre elles étaient devenues capables de croître sur milieu minimum. Aucune ne l'était. Ceci signifiait qu'un *contact physique* entre les deux souches était nécessaire pour que des cellules de type sauvage apparaissent. Il se confirmait donc qu'un transfert de gènes avait effectivement lieu, qui produisait des recombinants génétiques.

La découverte du facteur de fertilité (F)

La démonstration de la polarité du transfert Ayant découvert que, tout comme les organismes supérieurs, les bactéries étaient capables d'échanger du matériel génétique, Lederberg et Tatum émirent l'hypothèse que les gènes bactériens pouvaient être également associés en groupes de gènes liés. Les deux chercheurs étendirent alors leurs expériences avec les souches A et B pour tester leur hypothèse. Leurs résultats établissaient clairement l'existence d'une liaison parce que les fréquences d'allèles obtenues dans des croisements A × B s'écartaient clairement du rapport 1 : 1 typique d'un assortiment indépendant. Toutefois, leurs résultats n'étaient pas faciles à interpréter, en grande partie parce qu'ils ne connaissaient pas la polarité du transfert génétique.

En 1953, William Hayes exploita les propriétés de l'antibiotique streptomycine pour montrer que dans ce type de croisement, le transfert génétique s'effectue dans un sens déterminé. Hayes vérifia les résultats de Lederberg et Tatum en utilisant un croisement analogue au leur :

Souche A Souche B

$met^- thr^+ leu^+ thi^+ \times met^+ thr^- leu^- thi^-$

Toutefois, il exposa une des deux souches à la streptomycine, ce qui inhibe la division cellulaire et finit par tuer les cellules, mais ne les empêche pas de participer à un croisement pendant un laps de temps limité. Il est possible d'éliminer la streptomycine par lavage après l'avoir fait agir sur une première souche, puis d'introduire la seconde souche qui n'est dès lors pas exposée à l'antibiotique. Lorsque Hayes traita la souche A à la streptomycine, puis y mélangea la souche B après avoir éliminé l'antibiotique et étala enfin le mélange sur un milieu minimum, il obtint le même nombre de colonies que dans une expérience de contrôle dans laquelle aucune des cultures n'avait été traitée à la streptomycine. Toutefois, lorsqu'il traita la souche B à l'antibiotique avant d'y ajouter la souche A, il n'obtint aucune colonie.

Cette expérience montra que tous les recombinants obtenus dans ces expériences de transfert génétique l'étaient au départ de la souche B. Donc la capacité de produire des colonies au départ de la souche B — mais pas de la souche A — sur le milieu sélectif (milieu minimum) était requise. L'interprétation évidente était que le transfert génétique n'était pas réciproque, mais avait lieu uniquement de la souche A vers la souche B.

Message Le transfert de matériel génétique chez *E. coli* n'est pas réciproque. Une souche agit comme un **donneur** et l'autre comme un **récepteur**.

Chez les souches utilisées par Hayes pour ses expériences, le donneur était encore capable de transmettre des gènes après exposition à la streptomycine, mais le récepteur était incapable de se diviser pour produire des colonies après traitement à l'antibiotique. Cette unidirectionnalité du transfert de gènes fut originellement attribuée à une différence sexuelle, le donneur étant appelé «mâle» et le récepteur «femelle». Bien que l'usage des termes «mâle» et «femelle» ait persisté, il nous faut souligner que ce type de transfert de gènes n'est pas assimilable à une reproduction sexuée. Lors du *transfert de gènes bactériens*, un organisme reçoit de l'information génétique d'un donneur ; l'organisme récepteur est modifié par cette information. Dans la *reproduction sexuée*, deux organismes contribuent de façon égale (ou presque) à la formation d'un nouvel organisme, et ce n'est que dans des cas tout à fait exceptionnels que l'un ou l'autre des parents s'en trouve modifié.

Perte et recouvrement de la faculté de transfert

Par accident, Hayes découvrit un variant de sa souche A originale (mâle) qui ne produisait plus de recombinants lors de croisements avec la souche B (femelle). Les mâles A avaient perdu la

capacité de transférer du matériel génétique et étaient devenus des «femelles». En étudiant ce variant «stérile», Hayes réalisa que la fertilité d'*E. coli* se perdait et se recouvrait assez facilement.

Hayes isola ensuite un mutant résistant à la streptomycine du variant stérile de A. Il mélangea ensuite les cellules stériles A str^r avec des cellules mâles fertiles A str^s. Il vit qu'au moins un tiers des cellules A str^r étaient devenues fertiles, à en juger par leur capacité de transférer des marqueurs génétiques à des femelles B. Hayes suggéra que la «virilité» ou faculté de transfert fût elle même un état héréditaire conféré par un **facteur de fertilité (F)**. Les souches femelles, dépourvues de F, se comportent comme des réceptrices. Elles sont donc appelées F^- et les mâles F^+.

Transfert de F pendant la conjugaison

Les croisements bactériens ne produisent en général que peu de recombinants. Par contre, le facteur F est transmis très efficacement par contact physique ou **conjugaison** entre bactéries. Hayes récupéra des cellules mâles fertiles str^r très peu de temps après avoir mélangé des cellules F^- str^r avec des F^+ str^s. Il semble y avoir un **transfert «infectieux»** du facteur F, beaucoup plus rapide que le transfert de marqueurs génétiques. La nature physique du facteur F ne fut identifiée que beaucoup plus tard, mais ces premières expériences montraient déjà clairement qu'il s'agissait d'un facteur héréditaire très mobile et peu lié aux marqueurs génétiques chromosomiques.

Les souches Hfr

Un progrès important fut réalisé lorsque Luca Cavalli-Sforza isola un nouveau type de cellule mâle à partir d'une souche F^+ (nous savons à présent qu'elle provient de l'intégration de F dans le chromosome). En croisement avec des femelles F^-, cette nouvelle souche produisait 1000 fois plus de recombinants entre marqueurs génétiques qu'une souche F^+ normale. Cavalli-Sforza désigna cette souche **Hfr** par référence à la haute fréquence de recombinaison. (Ce dérivé fut par la suite désigné Hfr C pour le distinguer d'une autre souche aux propriétés similaire, Hfr H, isolée par Hayes.) Dans les croisements $F^+ \times F^-$, une part importante des «parents» F^- se trouve convertie en F^+ par transfert infectieux du facteur de fertilité. Par contre, dans les croisements Hfr × F^-, pratiquement aucun des parents F^- n'est converti en F^+ ou en Hfr. Le transfert infectieux du facteur de fertilité F n'a pas lieu dans ces croisements puisque, nous le savons à présent, F n'est plus dans le cytoplasme.

L'établissement de la liaison génétique par des expériences de croisement interrompu

La nature exacte des souches Hfr se précisa en 1957, quand Elie Wollman et François Jacob étudièrent le schéma de transmission des gènes de Hfr aux cellules F^- lors d'un croisement. Ils croisèrent un Hfr str^s a^+ b^+ c^+ d^+ avec une F^- str^r a^- b^- c^- d^- et prélevèrent des échantillons à intervalles de temps réguliers après le mélange des cellules. Chaque échantillon fut agité quelques secondes dans un mixeur ménager afin de séparer les paires de cellules engagées dans le croisement, puis étalé sur un milieu contenant de la streptomycine pour tuer les cellules Hfr donneuses. Ce protocole expérimental s'appelle **croisement interrompu**. Les cellules str^r furent alors analysées pour la présence de marqueurs alléliques du donneur. Celles qui contenaient des marqueurs du donneur devaient avoir participé à la conjugaison ; de telles cellules sont appelées **exconjugants**. La figure 10-6a montre une représentation graphique des résultats ; azi^r, ton^r, lac^+ et gal^+ correspondent aux symboles a^+, b^+, c^+ et d^+ utilisés dans notre description générale de ce type d'expérience. La figure 10-6b décrit le processus de transfert.

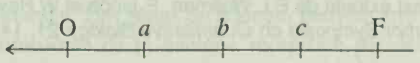
Ce qui frappe le plus dans ces résultats est que chaque allèle du donneur apparaît pour la première fois dans les exconjugants à un instant précis après le début du croisement. Par conséquent, les allèles du donneur apparaissent dans un ordre déterminé. En outre, le nombre maximal d'exconjugants contenant un allèle déterminé du donneur est d'autant plus faible que ce marqueur entre plus tard. En intégrant toutes ces observations, Wollman et Jacob conclurent que le transfert génétique s'opère à partir d'un point précis du chromosome du donneur, appelé **origine (O)**, et procède de façon linéaire.

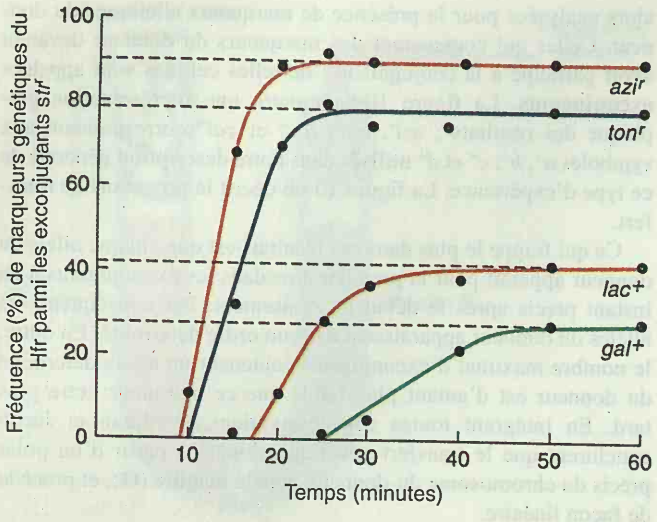
Message Le chromosome d'un Hfr, qui est normalement circulaire, est incisé puis transféré dans la cellule F^- de façon linéaire à partir d'un point déterminé appelé **origine (O)**. Plus un gène se trouve éloigné de O, plus tard il est transféré dans la F^-. La probabilité est grande que le processus de transfert s'interrompe de lui-même avant que les gènes les plus «tardifs» soient transférés.

Wollman et Jacob réalisèrent qu'il serait facile de construire des cartes de liaison à partir des résultats d'expériences de croisement interrompu en utilisant comme mesure de la «distance» les temps auxquels les marqueurs apparaissent pour la première fois après le croisement. Dans ce cas, les unités de distances sont des minutes. C'est ainsi que si b^+ pénètre dans la cellule F^- 10 minutes après a^+, a^+ et b^+ sont à 10 unités l'un de l'autre (figure 10-7). Comme les cartes établies sur la base de fréquences de crossing-over, ces cartes sont de pures constructions génétiques. A l'époque où elles furent élaborées pour la première fois, elles ne reposaient sur aucune donnée physique.

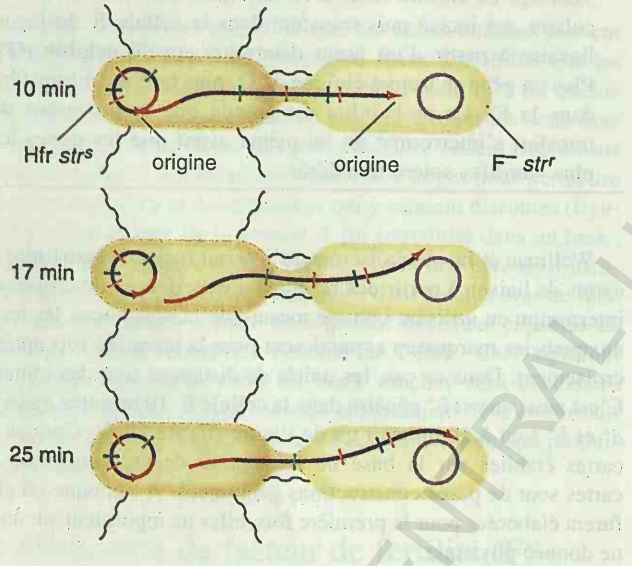
La circularité du chromosome et l'intégration de F

Lorsque Wollman et Jacob laissèrent des croisements Hfr × F^- se poursuivre pendant deux heures ou davantage avant interruption au mixeur, ils découvrirent que certains des exconjugants étaient finalement convertis en Hfr. En d'autres termes, une partie importante du facteur de fertilité conférant la «virilité» (la portion terminale de F qui confère la capacité de transfert) était finalement transmise, mais peu efficacement et, apparemment, comme si elle était le dernier marqueur d'un «chromosome» linéaire. La représentation que nous pouvons nous faire du phénomène est à présent la suivante :





(a)



(b)

Figure 10-6. Expérience de croisement interrompu chez *E. coli*. Des cellules F⁻ *str*ʳ sont mises à conjuguer avec des cellules Hfr *str*ˢ. Les cellules F⁻ contiennent une série de mutations (désignées *azi, ton, lac, gal*) qui les empêchent de réaliser certaines étapes du métabolisme. Par contre, les Hfr sont capables d'effectuer toutes ces étapes. A différents temps après le mélange des cellules, des échantillons sont prélevés, passés au mixeur pour rompre les contacts entre cellules et interrompre la conjugaison, puis étalés sur des milieux contenant de la streptomycine. L'antibiotique tue les cellules Hfr, mais pas les F⁻ qui peuvent être testées pour leur capacité d'effectuer les quatre étapes métaboliques considérées ici. (a) Un graphique montrant la fréquence d'apparition de chaque type de recombinants en fonction du temps écoulé depuis le début de la conjugaison. Le transfert de l'allèle du donneur conférant la capacité d'effectuer chacune de ces étapes dépend manifestement du temps pendant lequel la conjugaison peut avoir lieu. (b) Une représentation schématique du transfert des marqueurs au cours du temps. (La partie (a) est extraite de E.L.Wollman, F.Jacob et W.Hayes, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 21, 141, 1956.)

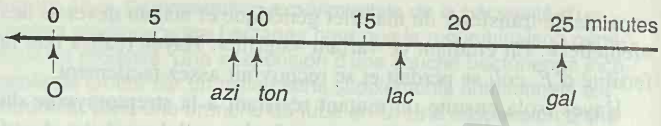


Figure 10-7. Carte chromosomique établie au départ des données de la figure 10-6. Il est possible de construire une carte de liaison du chromosome d'*E. coli* basée sur des expériences de croisement interrompu, en utilisant les temps auxquels les marqueurs transférés par le donneur apparaissent pour la première fois après le début du croisement. Les distances sont exprimées en minutes; la flèche indique le sens du transfert des allèles du donneur.

Toutefois, quand on eut établi les cartes de liaison de différents Hfr par croisements interrompus et détermination du «temps de pénétration», il apparut que les cartes étaient différentes :

Hfr H	O *thr pro lac pur gal his gly thi* F
1	O *thr thi gly his gal pur lac pro* F
2	O *pro thr thi gly his gal pur lac* F
3	O *pur lac pro thr thi gly his gal* F
AB 312	O *thi thr pro lac pur gal his gly* F

A première vue, on pourrait croire à une redistribution aléatoire des gènes. Toutefois, un fil conducteur apparaît : les gènes ne sont pas assemblés au hasard dans chaque souche. Notez par exemple que le gène *his* est toujours flanqué par *gal* et *gly*. Ce genre d'observation peut s'appliquer à chacun des gènes repris ici, sauf quand il se trouve à une des extrémités de la carte de liaison. L'ordre de transfert des gènes n'est donc pas immuable. Dans deux souches Hfr par exemple, le gène *his* est transféré avant le gène *gly* (*his* est plus proche de O), mais dans trois autres, *gly* est transféré avant *his*.

C'est alors que Wollman et Jacob formulèrent une hypothèse prenant en compte tous ces résultats. Supposons que dans un mâle F⁺, F soit un petit élément cytoplasmique (donc aisément transférable à une F⁻ par conjugaison). Si le «chromosome» du mâle F⁺ était un *anneau*, les différents chromosomes linéaires des Hfr pourraient être produits par l'insertion de F à différentes positions dans l'anneau et dans l'orientation appropriée (figure 10-8).

Cette hypothèse – qui fut confirmée par la suite – a plusieurs implications.

1. L'orientaion dans laquelle F s'insère détermine la polarité du transfert du chromosome de la souche Hfr, comme l'indique la figure 10-8a.
2. L'**origine** du transfert se trouve près d'une extrémité du facteur F intégré; le **terminus** du transfert est proche de l'autre extrémité de F et ne sera lui-même transféré qu'après que tout le chromosome l'ait été. Comme il arrive souvent que le chromosome se brise avant qu'il ait été transféré complètement, et comme c'est le terminus de F qui confère la capacité de transfert, seule une petite fraction des cellules réceptrices seront converties en cellules donneuses

MCGILL CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

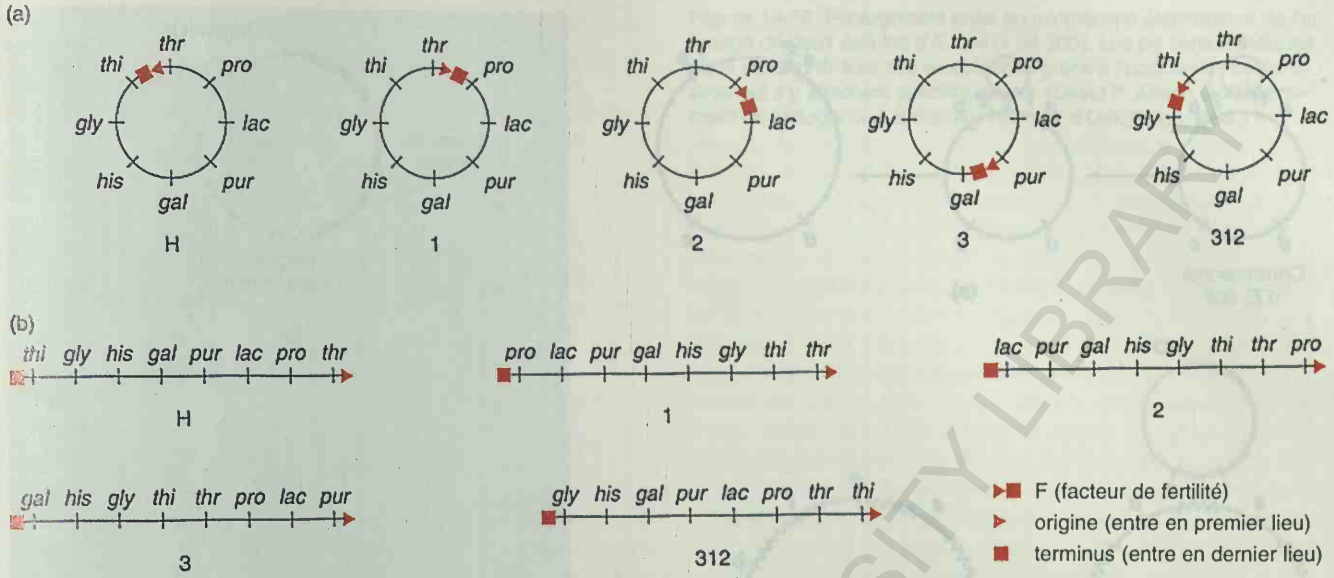


Figure 10-8. Circularité du chromosome d'*E. coli*. (a) L'utilisation dans des expériences de croisements interrompus de souches Hfr (H, 1, 2, 3, 312) qui diffèrent entre elles par le site et le sens d'insertion du facteur de fertilité dans le chromosome, révèle que ce dernier est circulaire. Les points de mobilisation du chromosome dans les différentes souches Hfr (origines) sont indiqués. (b) L'ordre de transfert des marqueurs par chaque souche Hfr; les pointes de flèches indiquent la position de l'origine et le sens du transfert.

Comment se produit l'intégration de F ? Wollman et Jacob suggérèrent qu'un événement du type crossing-over entre F et le chromosome circulaire puisse produire le chromosome Hfr. Alan Campbell précisa alors cette notion en suggérant que F soit circulaire comme le chromosome. Un crossing-over unique entre ces deux structures circulaires produirait dès lors un seul anneau dans lequel F se trouverait intégré (figure 10-9a).

Supposons à présent que F contienne trois régions aux vocations différentes, comme l'illustre la figure 10-9b. Si l'on imagine un chromosome bactérien possédant différentes régions d'homologie avec la région d'appariement de F, on comprend comment des chromosomes de Hfr différents peuvent être produits par des crossing-over au niveau de ces différentes régions (figure 10-9c). La circularité du chromosome et de F n'étaient originellement que des hypothèses basées sur des données fournies par l'analyse génétique. La réalité physique de ces concepts ne fut confirmée que plusieurs années plus tard. Ce modèle d'intégration par crossing-over unique fut également confirmé expérimentalement par la suite.

Les épisomes

Le facteur de fertilité peut donc se présenter sous deux formes : (1) à l'état libre, il est un élément cytoplasmique aisément transférable à des F^- réceptrices, tandis qu'à l'état intégré (2) , il constitue une partie du chromosome qui n'est transmise que tardivement, en fin de conjugaison. Le terme **épisome** (littéralement «corpuscule supplémentaire») a été créé pour désigner les particules génétiques présentant ces deux types d'états. Une cellule qui contient F dans le premier état est appelée F^+, une cellule contenant F dans le second état est une cellule Hfr et une cellule dépourvue de F est une cellule F^-.

On a découvert d'autres éléments transmissibles que F chez *E. coli* et chez d'autres bactéries. Certains sont des épisomes capables comme F de s'intégrer dans le chromosome circulaire. Quand F ou ces autres facteurs se trouvent à l'état libre dans le cytoplasme, ils sont appelés **plasmides**. Certains plasmides (dont beaucoup sont utilisés dans la méthodologie de l'ADN recombinant exposée au chapitre 14) ne peuvent s'intégrer dans le chromosome, tandis que d'autres, tels que les phages tempérés (voir à la page 297) sont des épisomes qui peuvent s'intégrer dans le chromosome bactérien comme le facteur F. Les plasmides jouent un rôle fondamental en ingénierie génétique; nous en parlerons plus en détail plus loin dans ce livre.

Message Un **épisome** est un facteur génétique bactérien qui peut exister sous forme d'élément libre dans le cytoplasme ou comme partie intégrante du chromosome. Le facteur F est un épisome.

Le mécanisme de transfert

Un Hfr meurt-il après avoir transféré son chromosome à une cellule F^- ? La réponse est non (à moins que la culture ne soit traitée à la streptomycine). Le chromosome du Hfr est répliqué pendant la conjugaison. Un brin du chromosome Hfr est transféré dans la cellule F^- où un brin complémentaire serait synthétisé ; l'autre brin du chromosome Hfr demeure dans la cellule donneuse où il sert également de modèle à la synthèse d'un complément, ce qui assure la conservation d'un chromosome complet par le donneur après le croisement. Des gènes du donneur peuvent être incorporés dans le chromosome de la bactérie réceptrice par des crossing-over, ce qui produit une cellule recombinante. S'ils ne sont pas incorporés, les fragments d'ADN donneur transférés dans la cellule réceptrice sont perdus lors des divisions cellulaires qui suivent.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

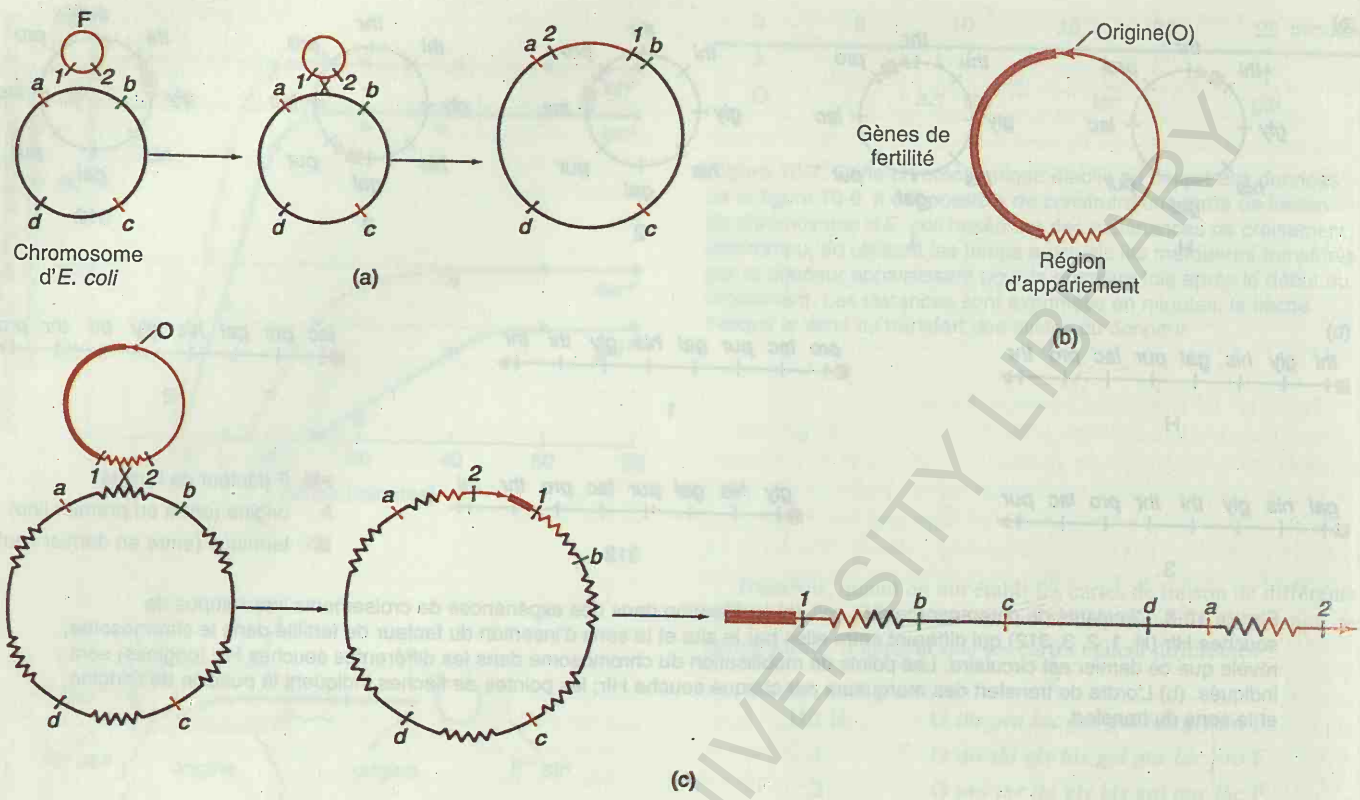


Figure 10-9. L'insertion du facteur F dans le chromosome d'*E. coli*. (a) Mécanisme d'insertion par la formation d'un crossing-over. (Les marqueurs symboliques 1 et 2 servent à orienter l'ADN inséré.) (b) Les trois domaines fonctionnels (à l'époque, hypothétiques) du facteur F. L'origine (O) est le point de mobilisation où commence le processus de transfert; la région d'appariement est homologue de région sur le chromosome d'*E. coli*; les gènes de fertilité sont responsables du phénotype F^+. (c) La région d'appariement de F peut présenter une homologie suffisante avec plusieurs régions du chromosome d'*E. coli* de sorte que F peut s'insérer par crossing-over au niveau de plusieurs sites chromosomiques. (Les zigzags représentent les régions d'homologie, les flèches indiquent la direction du transfert et son origine, O.) Dans l'exemple choisi, la cellule Hfr transfère ses gènes dans l'ordre *a, d, c, b*. Quel serait l'ordre du transfert si F était inséré au niveau des autres régions d'homologie?

Il est raisonnable de supposer que le chromosome de la bactérie F^- est, lui aussi, circulaire, parce qu'une F^- est facilement transformée en F^+, laquelle peut à son tour devenir Hfr.

La représentation que l'on peut se faire du mécanisme de transfert est celle d'un Hfr dévidant une copie d'un brin de son chromosome circulaire qui est transférée linéairement dans la cellule F^-. Comment ce transfert s'effectue-t-il ? Les images de microscopie électronique nous montrent que les cellules Hfr et F^+ possèdent, attachées à leur enveloppe, des structures filamenteuses appelées **pili F** ou **pili sexuels** (au singulier pilus) qui sont impliquées dans la reconnaissance et le maintien du contact avec les cellules F^- qui n'ont pas de pili (figure 10-10). Le transfert d'ADN s'opère apparemment au travers de pores de la cellule F^-, mais le mécanisme exact n'a pas encore été élucidé.

Le cycle conjugatif d'*E. coli*

Nous pouvons à présent passer en revue les différents aspects du cycle de conjugaison chez *E. coli* (figure 10-11).

Passons en revue les différences entre souches F^-, F^+ et Hfr, qui permettent de comprendre le cycle conjugatif.

Les souches F^- ne contiennent pas le facteur F et sont incapables de transmettre de l'ADN par conjugaison. Elles constituent par contre d'excellentes réceptrices de l'ADN transmis par d'autres souches.

Les cellules F^+ contiennent le facteur F dans leur cytoplasme. Cet élément peut être transmis de façon très efficace à des cellules F^- lors de la conjugaison.

Les cellules Hfr contiennent F intégré dans le chromosome bactérien . Il n'est donc plus dans le cytoplasme.

Des marqueurs chromosomiques sont transférés par une souche F^+ parce qu'une petite fraction de la population des cellules F^+ (environ une sur mille) a été convertie en cellules Hfr par l'intégration de F dans le chromosome. Comme les expériences de conjugaison s'effectuent généralement en mélangeant de 10^7 à 10^8

BIBLIOTECA CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

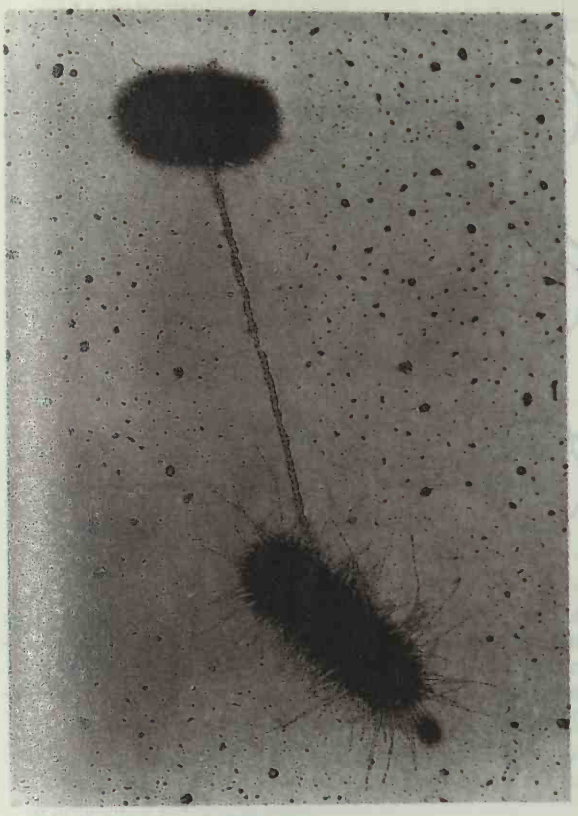


Figure 10-10. Photographie prise au microscope électronique de l'arrimage de deux cellules d'*E. coli* (× 34.300). Les pili caractéristiques de la cellule Hfr sont mis en évidence grâce à l'addition de certains virus qui s'y attachent spécifiquement. (David P. Allison du département de biologie du Laboratoire National d'Oak Ridge, USA.)

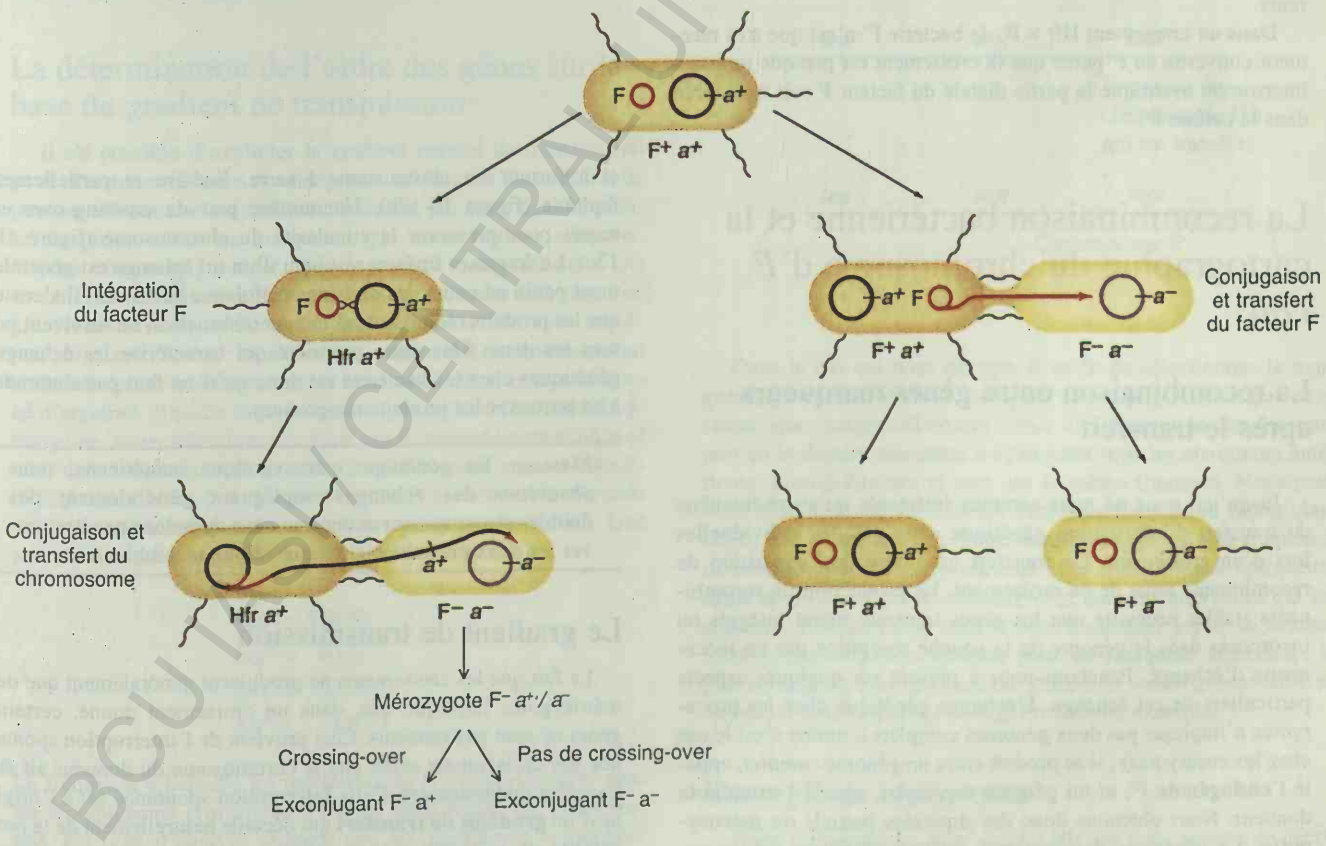


Figure 10-11. Résumé des événements du cycle conjugatif d'*E. coli*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cellules du donneur et du récepteur potentiels, la population des F^+ contient de nombreuses cellules chez lesquelles, de façon indépendante, le facteur F s'est intégré dans le chromosome. Par conséquent, ces cellules initieront le transfert de marqueurs en différents points du chromosome. Ceci aura pour résultat que des marqueurs répartis sur la totalité du chromosome seront transmis avec des fréquences approximativement équivalentes, mais basses. C'est ce type de transmission par des F^+ que Lederberg et Tatum ont observé lors de leur découverte du phénomène de conjugaison. Toute cellule contenant un F intégré peut être l'ancêtre d'une nouvelle souche Hfr si elle est isolée et cultivée pour établir un clone.

Les souches Hfr sont issues d'un clone de cellules chez lesquelles le facteur F fut intégré en un endroit déterminé du chromosome. Toutes les cellules d'une population de Hfr contiennent dès lors le facteur F intégré exactement au même endroit sur le chromosome et transmettent toujours les marqueurs chromosomiques à partir de ce point, dans le même ordre et avec une fréquence élevée. Ces caractéristiques les différencient des populations de cellules F^+.

Les populations de Hfr transfèrent des marqueurs chromosomiques aux cellules F^- avec une fréquence élevée si on la compare à celle des populations de F^+. En effet, seule une fraction des cellules d'une population F^+ contient un F intégré dans le chromosome. De plus, toute souche Hfr transfèrera les marqueurs à partir d'un point spécifique du chromosome et dans un ordre déterminé, ce qui contraste avec les populations F^+ dont les quelques cellules Hfr contiennent un facteur F intégré à des sites chromosomiques différents et transfèrent donc les marqueurs dans des ordres différents.

Dans un croisement Hfr × F^-, la bactérie F^- n'est que très rarement convertie en F^+parce que le croisement est presque toujours interrompu avant que la partie distale du facteur F soit transférée dans la cellule F^-.

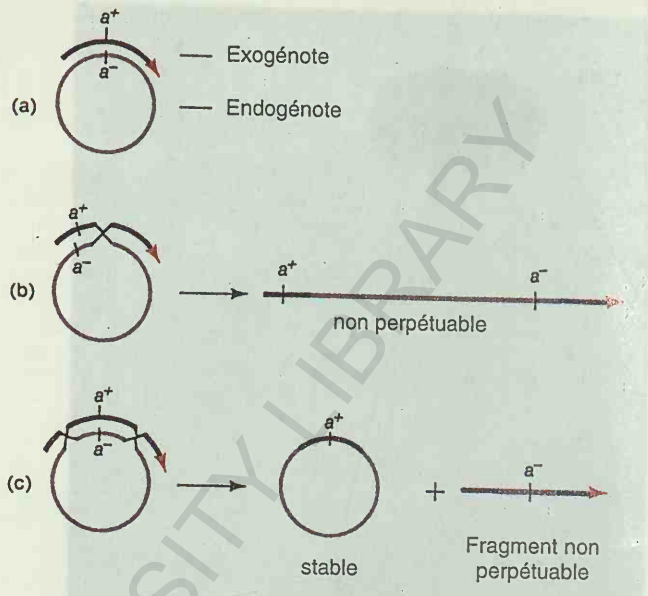


Figure 10-12. Crossing-over entre l'exogénote et l'endogénote dans un mérozygote. (a) Le mérozygote. (b) Un crossing-over unique produit un chromosome linéaire partiellement diploïde. (c) Un nombre pair de crossing-over produit un chromosome circulaire plus un fragment linéaire.

La recombinaison bactérienne et la cartographie du chromosome d'*E. coli*

La recombinaison entre gènes marqueurs après le transfert

Jusqu'ici, nous ne nous sommes intéressés qu'au phénomène du transfert d'information génétique entre cellules individuelles lors d'un croisement. Ce transfert est inféré de l'apparition de recombinants issus de ce croisement. La production de recombinants stables nécessite que les gènes transmis soient intégrés ou incorporés dans le génome de la souche réceptrice par un mécanisme d'échange. Penchons-nous à présent sur quelques aspects particuliers de cet échange. L'échange génétique chez les procaryotes n'implique pas deux génomes complets (comme c'est le cas chez les eucaryotes) ; il se produit entre un génome *complet*, appelé l'**endogénote** F^-, et un génome *incomplet*, appelé l'**exogénote** donneur. Nous obtenons donc des diploïdes partiels ou **mérozygotes**. La génétique des bactéries est une génétique mérozygotique. La figure 10-12a représente un échange génétique chez un mérozygote.

Un seul crossing-over ne peut suffire à produire des recombinants viables, puisqu'il revient à ouvrir le chromosome circulaire et à former un chromosome bizarre, linéaire et partiellement diploïde (figure 10-12b). Un nombre pair de crossing-over est requis pour préserver la circularité du chromosome (figure 10-12c). Le fragment linéaire résultant d'un tel échange est généralement perdu au cours des divisions cellulaires suivantes. Il s'ensuit que les produits réciproques d'une recombinaison ne survivent pas tous les deux. Une autre propriété qui caractérise les échanges génétiques chez les bactéries est donc qu'il ne faut pas s'attendre à en retrouver les produits réciproques.

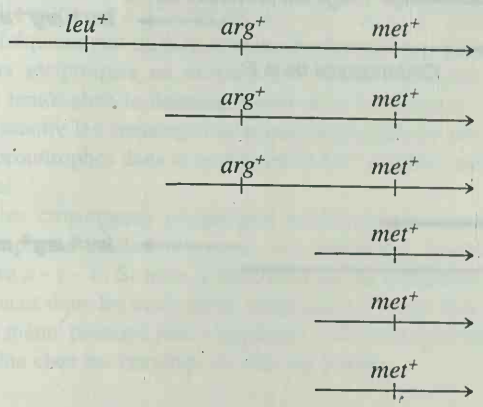
Message En génétique mérozygotique bactérienne, nous observons des échanges impliquant généralement des doubles crossing-over et nous ne nous attendons pas à retrouver les deux produits réciproques d'une recombinaison.

Le gradient de transmission

Le fait que les croisements ne produisent généralement que des mérozygotes implique que, dans un croisement donné, certains gènes ne sont pas transmis. Ceci provient de l'interruption spontanée des croisements avant que le chromosome du donneur ait été transféré intégralement. Cette interruption spontanée est à l'origine d'un **gradient de transfert** qui découle naturellement de la probabilité décroissante qu'une cellule réceptrice reçoive des marqueurs de plus en plus «tardifs». («Tardifs» signifie ici que ces marqueurs sont transmis tardivement dans la séquence spécifique d'un croisement déterminé.) Par exemple, dans un croisement où un Hfr transmet des marqueurs dans l'ordre *met* - *arg* - *leu*, nous

MAC / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

nous attendons à une distribution des fragments transmis semblable à celle-ci :



Davantage de fragments portent le locus *met* que le locus *arg*, et le locus *leu* n'est présent que sur un des fragments. On perçoit aisément que, plus un marqueur se trouve proche de l'origine du transfert, plus il a de chances d'être transmis au cours de la conjugaison.

La notion de gradient de transmission présentée ici est la même que celle évoquée précédemment dans le cas d'expériences de croisement interrompu, mais elle repose cette fois sur la séparation naturelle des paires de bactéries conjugantes et non sur leur rupture provoquée mécaniquement.

La détermination de l'ordre des gènes sur la base du gradient de transmission

Il est possible d'exploiter le gradient naturel de transmission pour déterminer l'ordre de marqueurs génétiques à condition de pouvoir sélectionner un marqueur précoce, qui entre dans la cellule réceptrice avant les marqueurs que nous voulons ordonner. Voyons comment procéder. Supposons que nous utilisions une souche Hfr qui transmet les marqueurs dans l'ordre *met, arg, aro, his*. Nous croisons un Hfr met^+, arg^+, aro^+, his^+ str^s avec une F^- met^-, arg^-, aro^-, his^- str^r et nous sélectionnons des recombinants qui croissent sur un milieu minimum sans méthionine, mais additionné d'arginine, d'acides aminés aromatiques, d'histidine et de streptomycine. Nous sélectionnons ainsi des F^- recombinantes qui sont met^+ dans un croisement au cours duquel le locus *met* est transféré le premier. Nous pouvons alors analyser ces recombinants pour voir s'ils ont hérité d'autres marqueurs présents chez le Hfr. Une analyse typique donnerait :

met^+ = 100 %
arg^+ = 60 %
aro^+ = 20 %
his^+ = 4 %

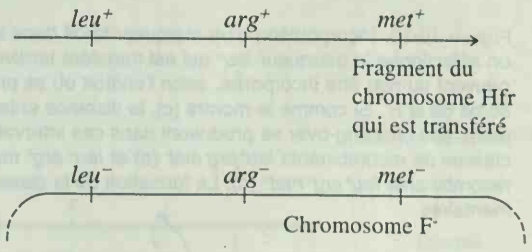
La fréquence à laquelle les marqueurs du Hfr sont retrouvés dans les recombinants correspond à l'ordre dans lequel ils sont transmis. Ce type d'analyse requiert que les marqueurs à ordonner soient transférés après le marqueur sélectionné (dans le cas présent, après *met*).

La conjugaison bactérienne permet également de réaliser une cartographie à plus haute résolution

Les expériences de croisement interrompu et l'exploitation du gradient naturel de transfert constituent des méthodes idéales pour localiser les gènes de façon sommaire sur la carte chromosomique. D'autres méthodes s'avèrent nécessaires si l'on désire obtenir une résolution plus fine entre marqueurs assez proches les uns des autres. Une approche consiste à utiliser la fréquence de recombinaison pour déterminer la liaison en termes quantitatifs.

Les premières tentatives de mesure de la liaison génétique par des expériences de conjugaison bactérienne échouèrent parce que l'on n'avait pas compris que seuls des fragments du chromosome sont transmis et que le gradient de transfert biaise les résultats en augmentant la fréquence d'apparition de recombinants pour les loci proches de l'origine de transfert. Pour déterminer la liaison et obtenir des distances cartographiques significatives, il est nécessaire d'établir des conditions dans lesquelles tous les marqueurs ont une probabilité égale d'être transmis, de sorte que les fréquences de recombinaison ne dépendent que de la distance entre les gènes considérés.

Considérons trois marqueurs : *met, arg* et *leu*. Si leur ordre est *met, arg, leu* et que *met* est transféré le premier et *leu* le dernier, nous devons arriver à produire la situation ci-dessous pour calculer les distances entre ces marqueurs.



Dans le cas qui nous occupe, il suffit de sélectionner le marqueur qui entre *le dernier*, donc leu^+. Pourquoi ? Parce que nous savons que chaque cellule qui a reçu un fragment de chromosome portant le dernier marqueur a également reçu les marqueurs antérieurs, c'est-à-dire *arg* et *met*, sur le même fragment. Nous pouvons alors calculer la distance cartographique de la façon classique, une unité cartographique (u.c.) étant égale à une fréquence de recombinaison de un pour cent, et la distance entre marqueurs égale au pourcentage de crossing-over dans les intervalles qui les séparent. Pratiquement, cela revient à calculer parmi le nombre total de recombinants obtenus pour un marqueur déterminé, le pourcentage de ceux qui l'ont été grâce à un crossing-over entre ce marqueur et le marqueur voisin. Prenons un exemple.

Exemple de croisement

Dans le croisement de la souche Hfr que nous venons de décrire (met^+, arg^+, leu^+, str^s) et d'une F^- qui serait met^-, arg^-, leu^-, str^r, nous sélectionnerions les recombinants leu^+, puis nous les exami-

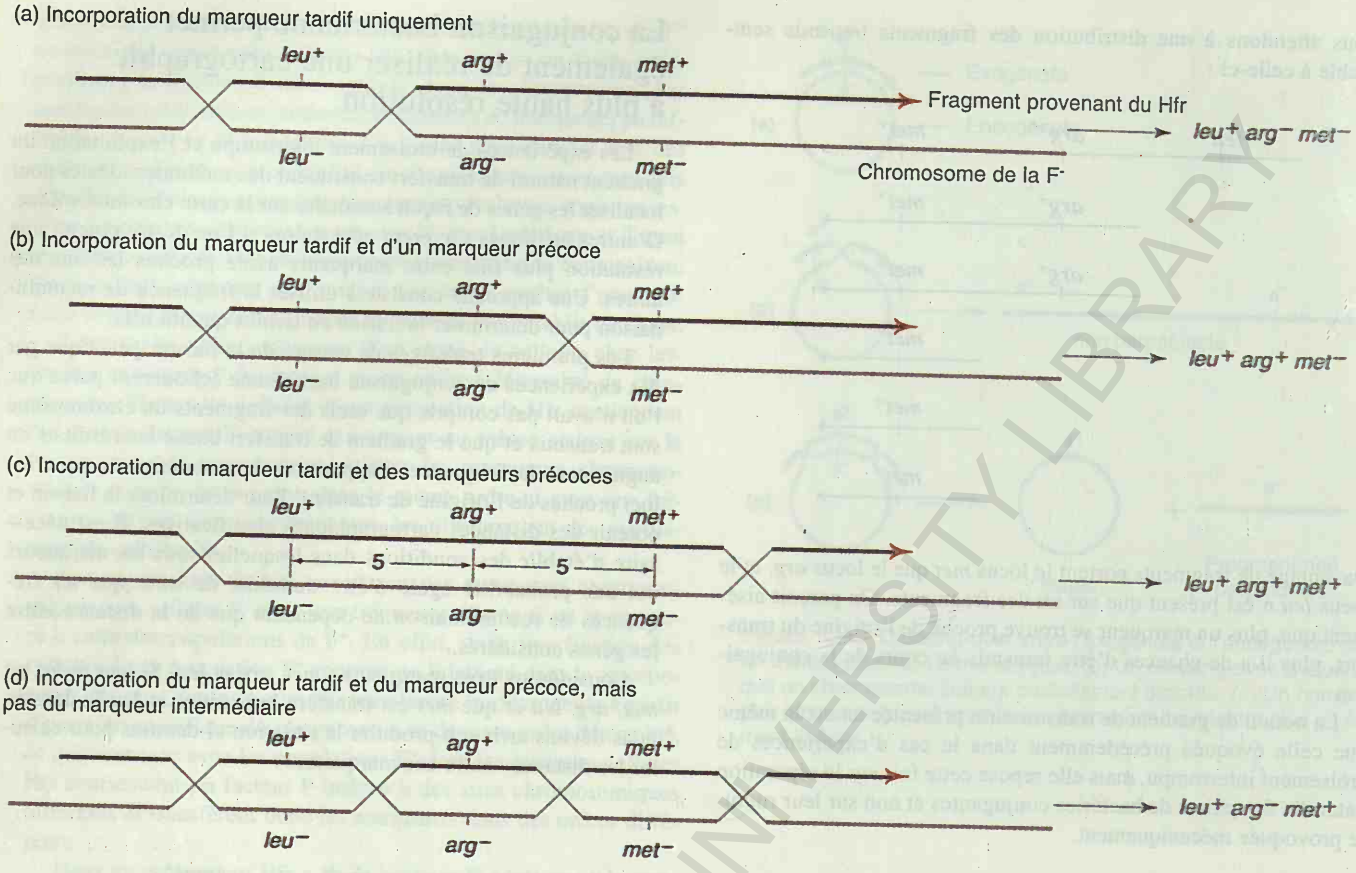


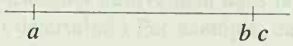
Figure 10-13. Incorporation d'un marqueur tardif dans le chromosome d'une souche F⁻ d'*E. coli*. Après croisement avec un Hfr, on sélectionne le marqueur *leu*⁺ qui est transféré tardivement (en fin de conjugaison). Les marqueurs précoces (*arg*⁺ et *met*⁺) peuvent ou non être incorporés, selon l'endroit où se produit la recombinaison entre le fragment provenant du Hfr et le chromosome de la F⁻. Si comme le montre (c), la distance entre *leu*⁺ et *arg*⁺ est de 5 u.c. et celle entre *arg*⁺ et *met*⁺ de 5 u.c.également, des crossing-over se produiront dans ces intervalles dans 5 pour cent des cas (a et b) et donneront naissance aux classes de recombinants *leu*⁺*arg met* (a) et *leu*⁺ *arg*⁺ *met* (b). Les crossing-over à l'extérieur de ces intervalles produisent les recombinants *leu*⁺*arg*⁺*met*⁺ (c). La formation de la classe de recombinants *leu*⁺ *arg met*⁺ nécessite deux crossing-over supplémentaires.

nerions pour établir l'allèle présent aux loci *arg* et *met*. Dans ce cas, les marqueurs *arg* et *met* sont appelés **marqueurs non sélectionnés**. La figure 10-13 montre les différentes combinaisons de crossing-over auxquelles on pourrait s'attendre. Rappelons-nous que deux crossing-over sont requis pour incorporer quelque partie que ce soit du chromosome transmis dans celui de la F⁻. Il faudra donc un crossing-over de part et d'autre du marqueur sélectionné (*leu*). Supposons que la distance cartographique entre chaque marqueur soit 5 u.c. (5 pour cent de recombinaison). Dans 5 pour cent des recombinants *leu*⁺, le second crossing-over aura lieu entre *leu* et *arg* (figure 10-13a) ; dans 5 autres pour cent des cas, le second crossing-over aura lieu entre *leu* et *met* (figure 10-13b). Nous devrions dès lors nous attendre à ce que 90 pour cent des recombinants *leu*⁺ sélectionnés soient *arg*⁺ *met*⁺, parce que le second crossing-over a eu lieu en dehors de l'intervalle *leu - arg - met* dans 90 pour cent des cas (figure 10-13c). Nous nous attendrions aussi à ce que 5 pour cent des recombinants *leu*⁺ soient *arg*⁻ *met*⁻, parce que produits par un crossing-over entre *leu* et *arg*, ainsi qu'à ce que 5 pour cent des *leu*⁺ soient *arg*⁺ *met*⁻, à la suite d'un crossing-over entre *arg* et *met*. En réalité, nous déterminons simplement le pourcentage de fois où le second crossing-over se produit dans chacun des trois intervalles considérés.

Dans un croisement tel celui que nous venons de décrire, la formation d'une classe de recombinants potentiels requiert deux crossing-over supplémentaires (figure 10-13d). Il s'agit des recombinants *leu*⁺ *arg*⁻ *met*⁺, dont la production requiert quatre crossing-over au lieu de deux. La fréquence d'apparition de tels recombinants est fortement réduite par rapport à celle des autres classes.

Détermination de l'ordre de gènes par des croisements réciproques

Il arrive souvent que deux loci soient si proches l'un de l'autre qu'il devient difficile de les ordonner par rapport à un troisième locus. Considérons, par exemple, trois loci présentant la liaison suivante :



BIOLOGY CENTRE UNIVERSITY LIBRARY

b et *c* sont ici trop étroitement liés pour être séparés facilement. La fréquence de recombinaison (FR) entre *a* et *b* sera, dans la plupart des conditions expérimentales, approximativement la même que celle entre *a* et *c*. L'ordre est-il *a* - *b* - *c* ou *a* - *c* - *b* ? Une technique fréquemment utilisée consiste à effectuer une paire de croisements réciproques en utilisant les mêmes marqueurs génotypiques tantôt chez le donneur, tantôt chez le récepteur. La figure 10-14 montre les crossing-over requis pour produire des recombinants prototrophes dans le croisement $a\ b\ c^+ \times a^+ b^+ c$, selon l'ordre des loci.

Si les croisements réciproques produisent des recombinants prototrophes avec des fréquences très différentes, l'ordre des loci doit être *a* - *c* - *b*. Si nous n'observons pas de différence entre ces fréquences dans les croisement réciproques, l'ordre doit être *a* - *b* - *c*. Le même principe peut s'appliquer à d'autres systèmes de cartographie chez les bactéries ou chez les phages.

Transfert génétique infectieux par des épisomes (sexduction)

Les travaux d'Edward Adelberg ont mené à la découverte du transfert de gènes à haute fréquence par des épisomes. Il commença en 1959 des expériences de recombinaison impliquant une souche Hfr particulière. La souche en question retournait fréquemment à l'état F^+, de sorte que les fréquences de recombinaison observées n'étaient pas très élevées. Adelberg désigna le facteur de fertilité de cette souche F', de façon à le distinguer du facteur F normal, pour les raisons suivantes :

1. La souche F^+ contenant le F' redevenait beaucoup plus fréquemment Hfr que les souches F^+ typiques.
2. Le facteur F' s'intégrait toujours *au même locus*, restituant ainsi le chromosome du Hfr original. (Rappelons-nous que les Hfr isolés de façon aléatoire au départ de mâles F^+ présentent une très large distribution d'origines de transfert.)

Comment expliquer les propriétés particulières du facteur F' ? La réponse vint de l'isolement d'un autre F' au départ d'un Hfr chez lequel le locus lac^+ était proche de la «queue» du chromosome Hfr (était transmis très tardivement dans la conjugaison). Au départ de ce Hfr lac^+, François Jacob et Adelberg obtinrent un dérivé F^+ qui transférait l'allèle lac^+ avec une très haute fréquence vers des réceptrices F^- lac^-. En outre, ces souches réceptrices devenues phénotypiquement F^+ lac^+ produisaient des cellules filles devenues F^- lac^- à la fréquence de 1×10^{-3}. Le génotype de ces réceptrices devait donc être F'lac^+/lac^-.

Voilà l'indication qui nous manquait : F' est un élément cytoplasmique qui transporte une partie du chromosome bactérien. Sa formation et sa réintégration peuvent être représentées comme sur la figure 10-15. Le F' en question est appelé F'-*lac* parce que le fragment de chromosome qu'il porte contient le groupe de gènes *lac*. Les facteurs F' peuvent porter une grande variété de gènes chromosomiques et ils sont chaque fois désignés d'après les gènes qu'ils contiennent. Par exemple, les facteurs F' qui portent les gènes *trp* ou les gènes *gal* sont appelés respectivement F'-*trp* et F'-*gal*. Comme les cellules F'-lac^+/lac^- ont un phénotype lac^+, nous en déduisons que lac^+ est dominant sur lac^-. Nous verrons dans le chapitre 18 que la connaissance de la relation de dominance-récessivité entre allèles constitue une information précieuse pour éluci-

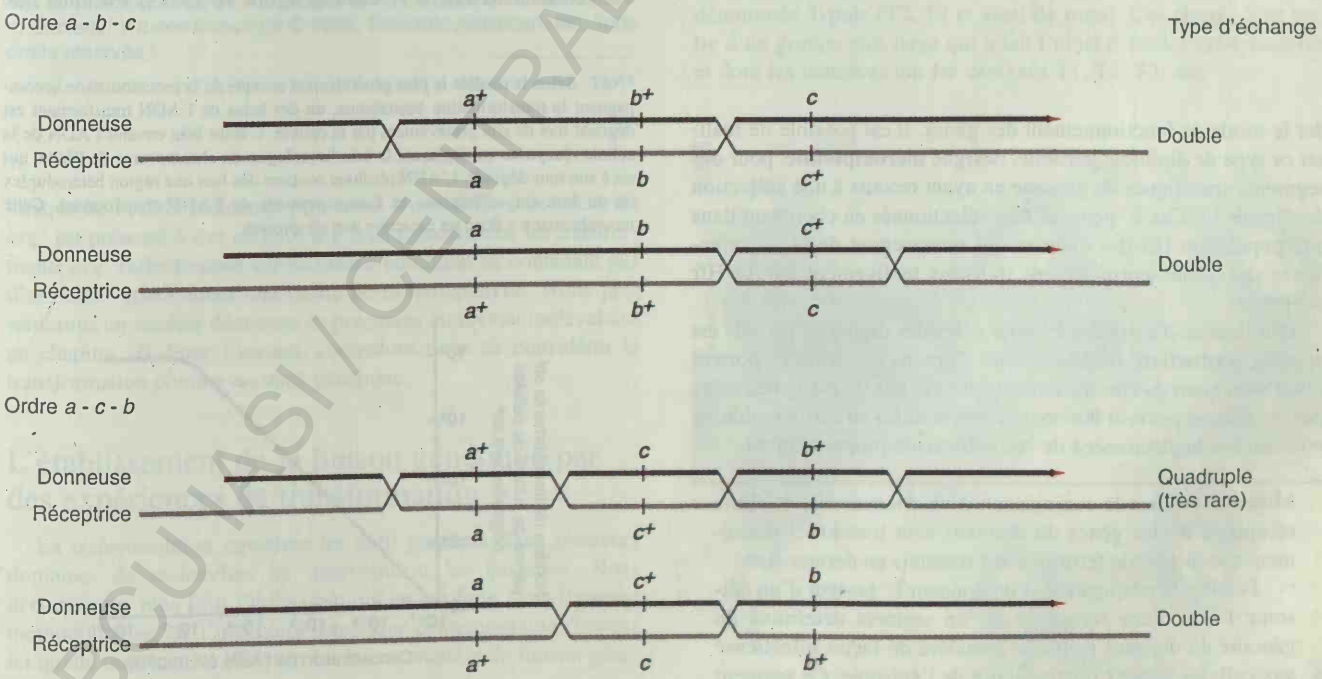


Figure 10-14. L'ordre des gènes peut être inféré des fréquences relatives des classes de recombinants dans des croisements réciproques entre parents de génotypes $a\ b + \times + + c$. Si l'ordre est *a* - *b* - *c*, la fréquence d'apparition des descendants + + + sera à peu près égale dans les croisements réciproques. Si par contre, l'ordre est *a* - *c* - *b*, les fréquences seront sensiblement différentes.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

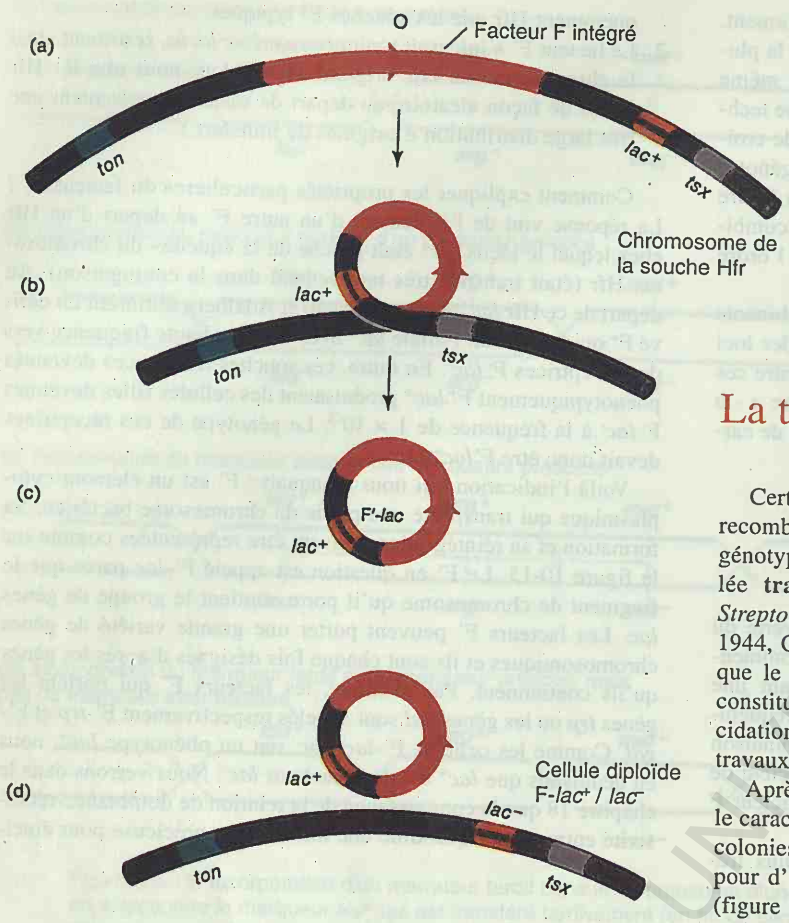


Figure 10-15. Production et transfert du facteur F'*lac* (ou F-*lac*). (a) Le facteur F est intégré dans le chromosome d'une souche Hfr entre les gènes *ton* et *lac*$^+$. (b) Circularisation et excision anormales du facteur F, englobant les gènes *lac*$^+$. (c) Le facteur F'-*lac*$^+$ (= F'*lac*$^+$). (d) Formation d'un diploïde partiel F'-*lac*$^+$ / *lac*$^-$ par transfert du facteur F'-*lac*$^+$ dans une souche réceptrice F$^-$*lac*$^-$. (Extrait de G.S. Stent et R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2d ed. Copyright © 1978, W.H. Freeman and Company.)

der le mode de fonctionnement des gènes. Il est possible de réaliser ce type de diploïdie partielle, désigné **mérodiploïdie**, pour des segments spécifiques du génome en ayant recours à une collection de dérivés F'. Ces F' peuvent être sélectionnés en cherchant dans une population Hfr des cellules qui transmettent de façon infectieuse des gènes normalement transmis tardivement par le Hfr considéré.

L'utilisation d'éléments F' pour créer des diploïdes partiels est appelée **sexduction**, ou F'-duction. Certains éléments F' portent jusqu'à un quart du chromosome bactérien. Les mérozygotes créés par sexduction peuvent être extrêmement utiles en cartographie ou pour étudier le phénomène de recombinaison proprement dit.

Message Pendant la conjugaison d'un donneur Hfr et d'une réceptrice F$^-$, les gènes du donneur sont transmis linéairement ; le facteur de fertilité F est transmis en dernier lieu.

Pendant la conjugaison d'un donneur F$^+$ porteur d'un épisome F', et d'une réceptrice F$^-$, un segment déterminé du génome du donneur peut être transféré de façon infectieuse aux cellules F$^-$ par l'intermédiaire de l'épisome. Ce segment de chromosome se trouvait être adjacent au locus du F intégré dans la souche Hfr dont le F$^+$ est issu.

La transformation bactérienne

Certaines bactéries peuvent transférer de l'ADN et produire des recombinants sans recourir à la conjugaison. La conversion d'un génotype en un autre par l'introduction d'ADN exogène est appelée **transformation**. La transformation fut découverte chez *Streptococcus pneumoniae* en 1928 par Frederick Griffith. En 1944, Oswald Avery, C.M. McLeod et M. McCarty démontrèrent que le «principe transformant» était l'ADN. Ces deux résultats constituèrent des étapes à marquer d'une pierre blanche dans l'élucidation de la nature moléculaire des gènes. Nous décrivons ces travaux plus en détail au chapitre 11.

Après qu'il fut démontré que l'ADN est l'agent qui détermine le caractère «production d'une capsule polysaccharidique» par les colonies de *S. pneumoniae,* la transformation fut mise en évidence pour d'autres traits, comme la résistance à certains antibiotiques (figure 10-16). L'ADN transformant est incorporé dans le chromosome par un processus semblable en apparence à celui décrit pour des croisements Hfr × F$^-$ dans la figure 10-12*. C'est ainsi que

*NdT : Selon le modèle le plus généralement accepté de la recombinaison accompagnant la transformation bactérienne, un des brins de l'ADN transformant est dégradé lors de son prélèvement par la cellule. L'autre brin envahit l'ADN de la cellule réceptrice en déplaçant le brin homologue du chromosome de l'hôte, qui est à son tour dégradé. L'ADN résultant contient dès lors une région hétéroduplex où un brin est «d'origine» et l'autre provient de l'ADN transformant. Cette recombinaison a donc un caractère non réciproque.

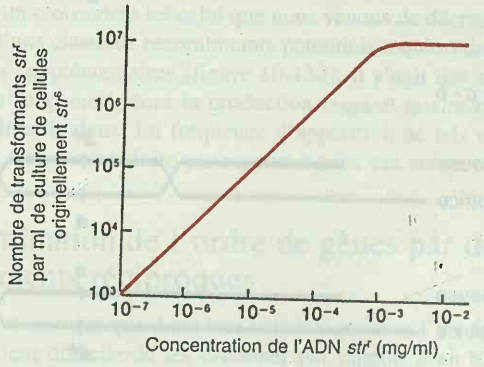


Figure 10-16. Le transfert génétique de la résistance à la streptomycine(*str*^{r}) à des cellules sensibles (*str*^{s}) d'*Escherichia coli*. Le rendement de la transformation (la quantité de cellules devenues *str*^{r}) est une fonction de la concentration de l'ADN transformant (*str*^{r}). (Extrait de G.S. Stent et R. Calendar,*Molecular Genetics*, 2d ed. Copyright © 1978, W.H. Freeman and Company.)

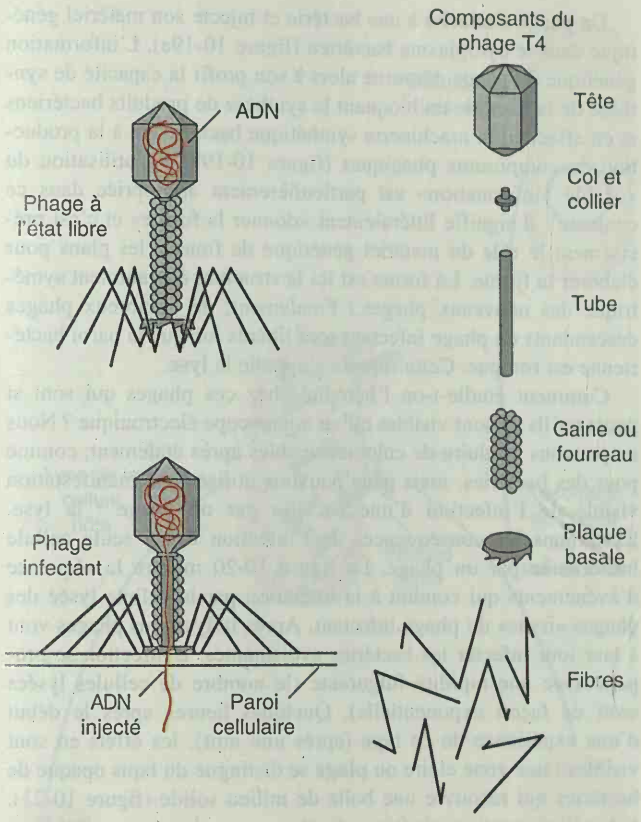


Figure 10-17. Le phage T4 représenté sous forme de particule virale isolée et en train d'infecter une cellule d'*E. coli*. Le phage injecte son ADN dans la cellule par le tube. A droite, une représentation éclatée et en trois dimensions de la structure extrêmement organisée du phage.(Extrait de R.S. Edgar et R.H. Epstein, *The Genetics of Bacterial Viruses* Copyright © 1965, Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

lorsque de l'ADN radioactif provenant d'une culture de bactéries arg^+ est présenté à des cellules arg^- non radioactives, les transformants arg^+ (sélectionnés sur un milieu minimum ne contenant pas d'arginine) contiennent une partie de la radioactivité. Nous présenterons un modèle décrivant ce processus au niveau moléculaire au chapitre 20. Pour l'instant, contentons-nous de considérer la transformation comme un outil génétique.

L'établissement de la liaison génétique par des expériences de transformation

La transformation constitue un outil précieux dans plusieurs domaines de recherches où interviennent les bactéries. Nous découvrirons plus loin l'utilisation qui en est faite dans l'arsenal méthodologique de l'ingénierie génétique contemporaine. Voyons ici quelle information elle peut fournir en matière de liaison génétique.

Lors de son extraction, l'ADN chromosomique bactérien subit inévitablement une fragmentation. Si deux gènes sont proches l'un de l'autre sur l'ADN chromosomique transformant, ils auront une grande probabilité de se retrouver ensemble sur un fragment et donc d'être à l'origine d'une **double transformation**. Inversement, si deux gènes se trouvent très éloignés l'un de l'autre, ils seront transportés par des fragments transformants distincts et la fréquence d'apparition de doubles transformants sera égale au produit des fréquences de transformation pour chaque gène considéré séparément. Il devrait donc être possible de déduire l'existence d'une liaison de l'écart à la règle du produit des fréquences.

Malheureusement, plusieurs facteurs contribuent à compliquer l'interprétation. Le plus important d'entre eux est que seule une partie des cellules d'une population bactérienne sont **compétentes**, c'est-à-dire en état d'être transformées. L'application efficace de la règle du produit des fréquences requiert en effet que les fréquences de transformation mesurées indépendamment le soient dans des populations contenant une même proportion de cellules compétentes. Il existe des méthodes d'évaluation de la proportion de cellules compétentes, mais nous ne les aborderons pas ici. Exercez-vous plutôt à l'analyse génétique par transformation en résolvant un des problèmes à la fin du chapitre, où l'on fait l'hypothèse que toutes les cellules sont compétentes.

La génétique des bactériophages

L'infection des bactéries par des phages

De nombreux bactériophages peuvent jouer un rôle dans le transfert de gènes bactériens. La plupart des bactéries sont susceptibles à l'attaque par des bactériophages (littéralement, «mangeurs de bactéries»). Un phage se compose d'une molécule d'acide nucléique — «chromosome» (de l'ADN ou de l'ARN) — enveloppée dans un manteau de protéines. Les figures 10-17 et 10-18 nous montrent la structure élaborée d'un phage de la classe dénommée **T-pair** (T2, T4 et ainsi de suite). Ces phages font partie d'un groupe plus large qui a fait l'objet d'études systématiques et dont les membres ont été désignés T1, T2, T3, etc.

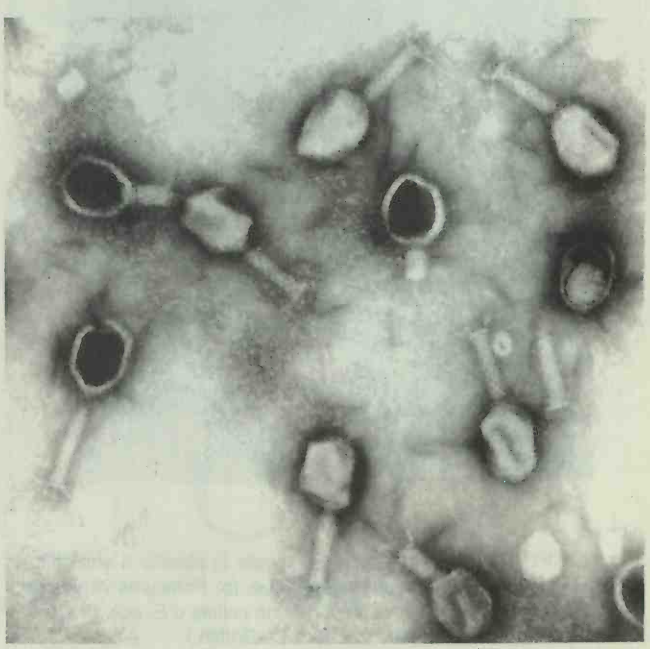
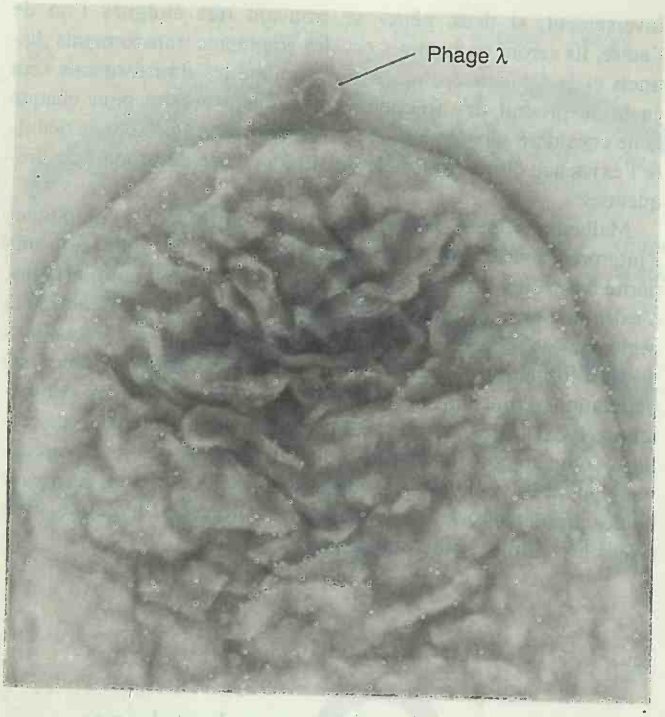
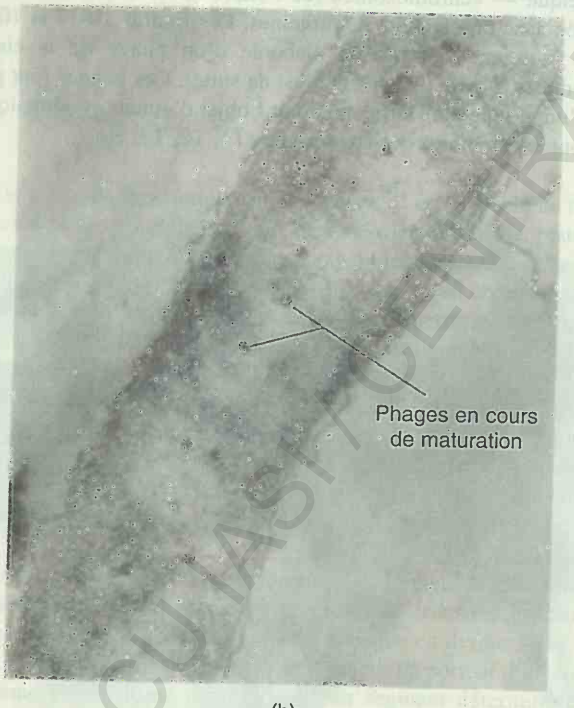


Figure 10-18. Particules virales matures du coliphage T4 (× 97.500). (Photo aimablement fournie par Grant Heilman.)

BIU MONTPELLIER CENTRAL UNIVERSITY



(a)



(b)

Figure 10-19. (a) Un bactériophage (appelé λ) attaché à une cellule d'*E.coli* et injectant son matériel génétique. (b) Particules virales de phage λ en cours de maturation dans une cellule d'*E. coli*. (Photos aimablement communiquées par Jack D. Griffith.)

Un phage s'attache à une bactérie et injecte son matériel génétique dans le cytoplasme bactérien (figure 10-19a). L'information génétique du phage détourne alors à son profit la capacité de synthèse de la bactérie en bloquant la synthèse de produits bactériens et en affectant la machinerie synthétique bactérienne à la production de composants phagiques (figure 10-19b). (L'utilisation du vocable «information» est particulièrement appropriée dans ce contexte : il signifie littéralement «donner la forme» et c'est précisément le rôle du matériel génétique de fournir les plans pour élaborer la forme. La forme est ici la structure élégamment symétrique des nouveaux phages.) Finalement, de nombreux phages descendants du phage infectant sont libérés lorsque la paroi bactérienne est rompue. Cette rupture s'appelle la **lyse**.

Comment étudie-t-on l'hérédité chez ces phages qui sont si petits qu'ils ne sont visibles qu'au microscope électronique ? Nous ne pouvons produire de colonies visibles après étalement, comme pour des bactéries, mais nous pouvons utiliser une manifestation visible de l'infection d'une bactérie par un phage : la lyse. Examinons les conséquences de l'infection d'une seule cellule bactérienne par un phage. La figure 10-20 montre la séquence d'événements qui conduit à la libération par la cellule lysée des phages «issus» du phage infectant. Après la lyse, ces phages vont à leur tour infecter les bactéries avoisinantes. L'infection se propage avec une rapidité fulgurante (le nombre de cellules lysées croît de façon exponentielle). Quelques heures après le début d'une expérience de ce type (après une nuit), les effets en sont visibles : une zone claire ou **plage** se distingue du tapis opaque de bactéries qui recouvre une boîte de milieu solide (figure 10-21). Selon l'information génétique du phage, ces plages seront plus ou moins grandes, auront des contours nets ou diffus. La **morphologie de la plage** est donc un trait génétique du phage utilisable pour l'analyse génétique.

Un autre phénotype phagique qui peut être utilisé est le **spectre d'hôtes**. Certaines souches bactériennes sont récalcitrantes à l'adsorption (l'attachement) ou à l'injection du chromosome des phages. Les phages, eux aussi, diffèrent entre eux par le spectre de souches bactériennes qu'ils peuvent infecter et lyser.

Le croisement de phages

Est-il possible de croiser deux phages comme on croise deux bactéries? Prenons comme exemple de croisement une expérience qui fut réalisée avec le phage T2 par Alfred Hershey. Les génotypes des deux souches de phage «parentales» croisées par Hershey étaient $h^- r^+ \times h^+ r^-$. Les allèles peuvent être identifiés de la façon suivante : h^- peut infecter deux souches différentes d'*Escherichia coli* (que nous désignerons souches 1 et 2) ; h^+ ne peut infecter que la souche 1 ; r^- provoque une lyse rapide des cellules et, par conséquent, produit de grandes plages ; r^+ lyse les cellules lentement et produit donc des plages plus petites.

L'expérience consiste à infecter la souche 1 par des phages T2 de deux génotypes parentaux à une **multiplicité d'infection** — c'est-à-dire un rapport phages / bactéries — suffisante pour que la plupart des cellules soient infectées simultanément par les deux

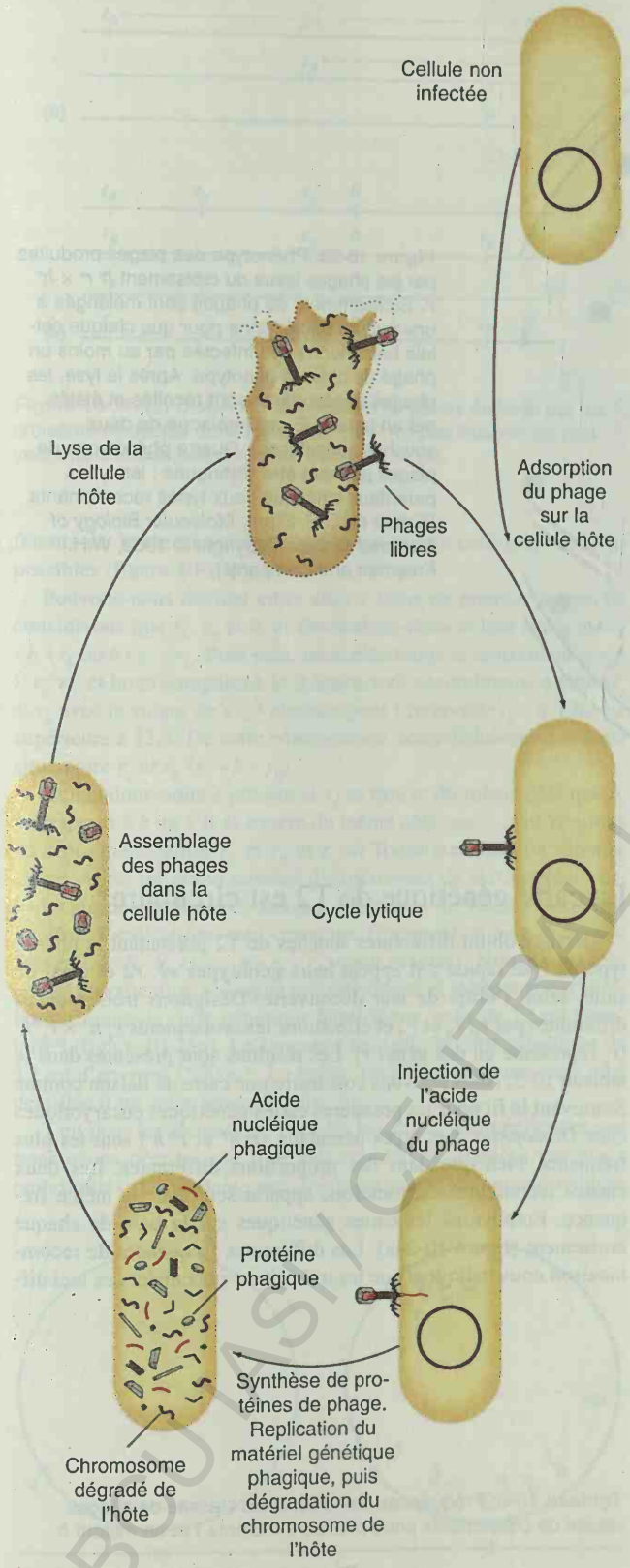


Figure 10-20. Le cycle lytique d'un bactériophage capable d'effectuer la transduction généralisée. (Extrait de J. Darnell, H. Lodish et D. Baltimore, *Molecular Cell Biology* Copyright © 1986, W.H. Freeman and Company.)

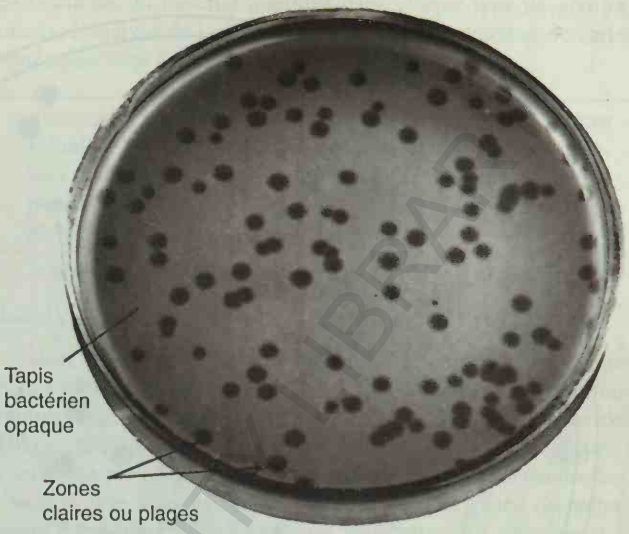


Figure 10-21. Plages de lyse. Un petit nombre de phages est étalé sur un milieu solide recouvert d'un tapis continu d'*E. coli*. Chaque phage infecte une cellule bactérienne, produisant une centaine de phages «descendants» qui vont lyser l'hôte bactérien et infecter les cellules avoisinantes. Celles-ci vont, à leur tour, libérer une descendance phagique et le processus se répètera, provoquant finalement l'apparition d'une zone claire, ou plage, dans le tapis bactérien opaque. (Extrait de G.S. Stent, *Molecular Cell Biology* Copyright © 1963, W.H. Freeman and Company.)

types de phages. Ce mode d'infection (figure 10-22) est appelé **infection mixte** ou **double.** Le lysat phagique (la descendance des phages infectants) est alors analysée par étalement sur un tapis bactérien contenant un mélange de cellules des souches 1 et 2. On observe quatre types de plages bien caractéristiques (figure 10-23 et tableau 10-2). Il est alors aisé de totaliser (tableau 10-3) les génotypes parentaux (h^-r^+ et h^+r^-) et recombinants (h^-r^- et h^+r^+), et de calculer une fréquence de recombinaison :

$$\text{FR} = \frac{(h^+r^+) + (h^-r^-)}{\text{nombre total de plages}}$$

Nous pouvons considérer que la recombinaison a lieu entre des génomes phagiques complets et donc que nous n'avons pas ici la situation mérozygotique caractéristique des croisements bactériens. Dans ces conditions, nous pouvons supposer que des

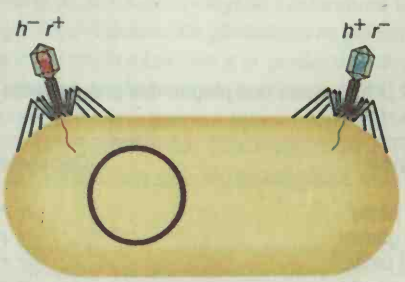


Figure 10-22. Infection double ou mixte d'*E. coli* par des phages.

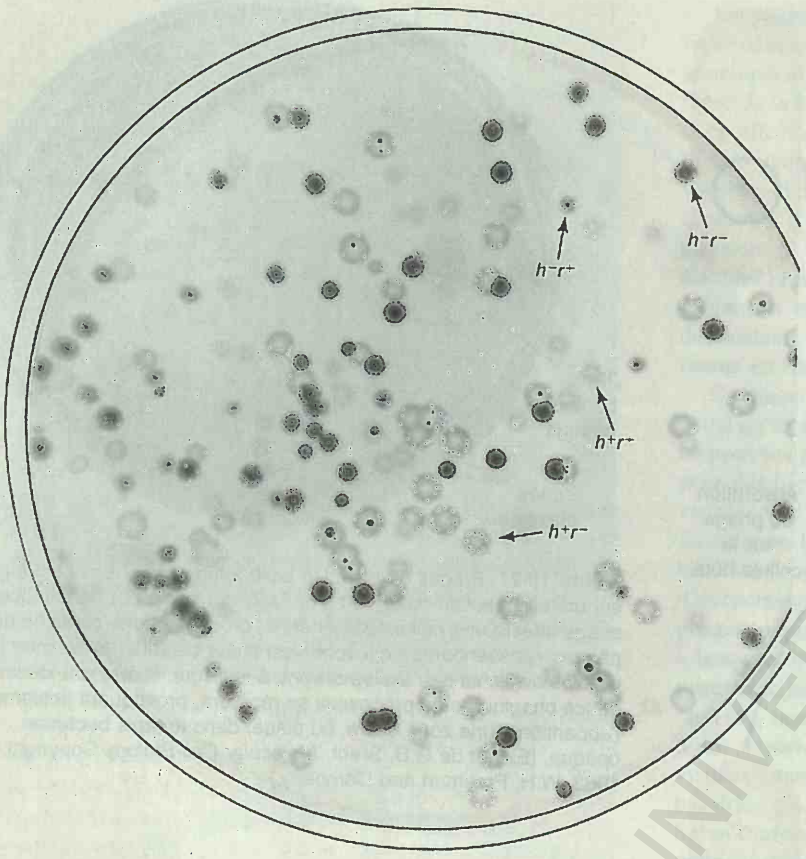


Figure 10-23. Phénotype des plages produites par les phages issus du croisement $h^- r^+ \times h^+ r^-$. Suffisamment de phages sont mélangés à une culture bactérienne pour que chaque cellule bactérienne soit infectée par au moins un phage de chaque génotype. Après la lyse, les phages descendants sont récoltés et étalés sur un tapis d'*E. coli*.(mélange de deux souches indicatrices). Quatre phénotypes de plages peuvent être distingués : les types parentaux ainsi que deux types recombinants. (Extrait de G.S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses* Copyright © 1963, W.H. Freeman and Company.)

échanges uniques produiront des produits réciproques viables. Toutefois, les croisements de phages sont sujets à certaines complications. D'abord, plusieurs **occasions d'échanges** se présenteront dans la bactérie-hôte : un recombinant formé peu après l'infection pourra participer à d'autres échanges plus tard dans le cycle. En second lieu, la recombinaison peut avoir lieu aussi bien entre des phages génétiquement identiques qu'entre phages de génotype différent. En d'autres termes, $P_1 \times P_1$ et $P_2 \times P_2$ se produiront tout autant que $P_1 \times P_2$. Pour ces deux raisons, les recombinants issus de croisements entre phages doivent être considérés comme résultant d'événements *multiples* et non d'un événement unique ayant lieu à un moment déterminé du cycle. Néanmoins, *toutes autres choses étant égales,* la formulation de la FR que nous avons donnée constitue une estimation correcte de la distance cartographique sur le génome phagique.

La carte génétique de T2 est circulaire*

Hershey obtint différentes souches de T2 présentant le phénotype de lyse rapide ; il appela leurs génotypes *r1, r2* et ainsi de suite, selon l'ordre de leur découverte. Désignons trois souches différentes par r_a, r_b et r_c, et effectuons les croisements $r_x^- h^+ \times r_x^+ h^-$ (r_x représente un des gènes *r*). Les résultats sont présentés dans le tableau 10-3. Nous pouvons construire une carte de liaison comme Sturtevant le fit pour les premières cartes génétiques eucaryotiques chez *Drosophila*. Les types parentaux ($r^- h^+$ et $r^+ h^-$) sont les plus fréquents, bien que dans des proportions différentes. Les deux classes recombinantes, toutefois, apparaissent avec la même fréquence. Etablissons les cartes génétiques sur la base de chaque croisement (figure 10-24a). Les différentes fréquences de recombinaison nous indiquent que les trois gènes *r* occupent des loci dif-

Tableau 10-2. Phénotypes des plages des phages issus du croisement $h^- r^+ \times h^+ r^-$.

Phénotype	Génotype inféré
Claire et petite	$h^- r^+$
Trouble et grande	$h^+ r^-$
Trouble et petite	$h^+ r^+$
Claire et grande	$h^- r^-$

NOTE : Le phénotype «clair» est produit par l'allèle h^-, qui permet d'infecter *les deux* souches constituant le tapis ; la turbidité résulte de la présence de l'allèle h^+, qui restreint l'infection aux cellules de la souche 1.

Tableau 10-3. Fréquences des différentes classes de phages issues de croisements entre plusieurs mutants *r* et un mutant *h*.

Croisement	Pourcentage de chaque génotype			
	$r\ h^+$	$r^+\ h^-$	$r^+\ h^+$	$r\ h^-$
$r_a^- h^+ \times r_a^+ h^-$	34,0	42,0	12,0	12,0
$r_b^- h^+ \times r_b^+ h^-$	32,0	56,0	5,9	6,4
$r_c^- h^+ \times r_c^+ h^-$	39,0	59,0	0,7	0,9

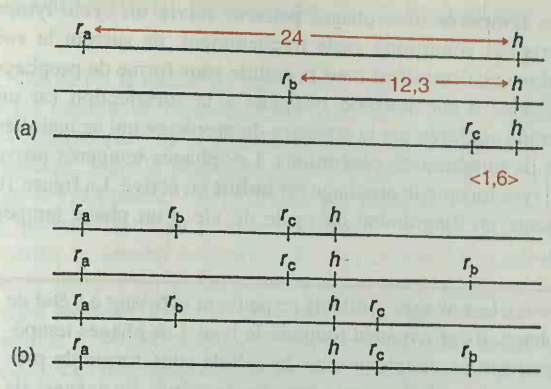


Figure 10-24. (a) Distances entre paires de gènes établies par les croisements décrits dans le tableau 10-4. (b) Les liaisons qui peuvent être inférées des distances données en (a).

férents sur le chromosome, de sorte que quatre cartographies sont possibles (figure 10-24b).

Pouvons-nous décider entre elles ? Dans un premier temps, ne considérons que r_b, r_c et *h*, et demandons-nous si leur ordre est r_c - *h* - r_b ou *h* - r_c - r_b. Pour cela, nous effectuons le croisement $r_c^- r_b^+ \times r_c^+ r_b^-$ et nous comparons la fréquence de recombinaison entre r_c et r_b avec la valeur de 12,3 obtenue pour l'intervalle r_b - *h*. Elle est supérieure à 12,3. De cette comparaison, nous déduisons que *h* est situé entre r_c et r_b (r_c - *h* - r_b).

Demandons-nous à présent si r_a se trouve du même côté que r_b par rapport à *h* ou s'il se trouve du même côté que r_c. Les résultats de croisements entre r_a et r_b et r_c ne fournissent pas de réponse claire. Après un grand nombre d'expériences de cartographie réalisées sur de nombreuses souches différentes de T2, il s'avère que *les deux* localisations sont correctes. Comment se peut-il qu'à la fois r_a - r_c - *h* - r_b et r_c - *h* - r_b - r_a soient exactes ? Nous avons rencontré une situation analogue précédemment et la réponse est similaire. Comme la carte génétique bactérienne, celle de T2 est circulaire* (figure 10-25a). La longueur totale de la carte génétique de T2 est d'environ 1500 u.c. La figure 10-25b montre une carte plus détaillée d'un autre phage T-pair.

Tant pour les phages que pour les bactéries, les expériences que nous avons décrites ont livré des résultats à première vue assez embrouillés. Cependant, une fois comprises les caractéristiques

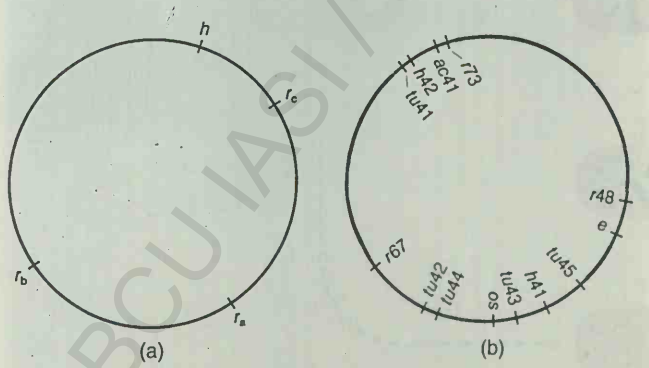


Figure 10-25. Représentation circulaire des cartes de phages de type T-pair. (a) Carte simplifiée du phage T2. (b) Carte du phage T4 établie par des croisements entre les mutants non létaux suivants : *r* (lyse rapide), *h* (spectre d'hôtes), *ac* (résistance aux acridines), *tu* (plages troubles), *os* (résistance aux chocs osmotiques) et *e* (incapable de lyser).

particulières du matériel impliqué dans chaque type de «croisement», l'analyse de la recombinaison et la construction de cartes génétiques sont des démarches assez immédiates.

Message La recombinaison entre chromosomes phagiques s'étudie en introduisant ensemble les chromosomes parentaux dans une même cellule-hôte par infection mixte. La proportion de génotypes parentaux et recombinants chez les phages produits est ensuite déterminée.

La lysogénie

Dans les années 1920, bien avant qu'*E. coli* devienne l'organisme préféré des généticiens de microbes, quelques observations intéressantes furent faites en étudiant l'infection d'*E. coli* par des phages. Certaines souches bactériennes apparaissaient résistantes à l'infection par certains phages, mais ces bactéries résistantes causaient la lyse d'autres bactéries non résistantes quand on mélangeait leurs cultures. Les bactéries résistantes qui provoquent la lyse d'autres cellules sont dites **lysogènes**. Apparemment, les cellules lysogènes étaient «porteuses» du phage tout en étant immunes à son action lytique. Quand des bactéries non lysogènes étaient infectées par les phages provenant d'une souche lysogène, une certaine fraction des cellules infectées ne se lysaient pas, mais devenaient lysogènes à leur tour. Ce phénomène ne retint initialement que très peu l'attention, surtout après que certains travaux semblèrent indiquer que les bactéries lysogènes étaient simplement contaminées par quelques phages à l'état libre qu'une purification soigneuse permettait d'éliminer.

Vers le milieu des années 1940 toutefois, André Lwoff se pencha sur des souches lysogènes de *Bacillus megaterium* et suivit le comportement d'une cellule lysogène au travers de plusieurs divisions cellulaires. En observant attentivement sa culture, il arrivait à séparer les deux cellules d'une paire immédiatement après la division cellulaire. Une des cellules était alors mise en culture, l'autre était observée de façon suivie jusqu'à sa division. De cette façon, Lwoff obtint 19 cultures représentant 19 générations (19 divisions cellulaires consécutives). Les 19 cultures étaient toutes lysogènes, mais des analyses du milieu de croissance ne révélèrent de phages à l'état libre à aucun moment au cours des 19 divisions, confirmant ainsi que le comportement lysogène se maintient par delà la reproduction même en l'absence de phages libres.

Dans de rares cas, Lwoff observa la lyse spontanée d'une de ses cultures. Si le milieu de cette culture était étalé sur un tapis de cellules non lysogènes, des plages de lyse apparaissaient, ce qui indiquait que des phages avaient été libérés par la lyse. Lwoff proposa une explication rendant compte de toutes ses observations : chaque bactérie de la souche lysogène contiendrait un facteur non infectieux qui serait transmis de génération en génération, mais qui donnerait occasionnellement lieu à la production de phages infectieux (en l'absence de phages dans le milieu). Lwoff appela ce facteur **prophage** parce qu'il pouvait *induire* la production d'une descendance phagique infectieuse. Des études ultérieures montrèrent que différents agents, tels que le rayonnement ultraviolet ou cer-

*NdT. La circularité des cartes génétiques bactérienne et phagique repose toutefois sur des bases différentes : si le chromosome bactérien est bien annulaire, celui des phages T est physiquement linéaire dans la particule virale. La circularité de la carte résulte, dans ce dernier cas, du fait que chaque chromosome phagique est une permutation circulaire différente d'une carte commune ; dès lors, la carte établie dans des expériences recourant à de larges populations semble ne pas avoir d'extrémités. Cette topographie particulière est liée au mode de réplication et d'incorporation du chromosome phagique dans l'enveloppe protéique.

BCU IASI / CENTRUL DE CULTURĂ ELECTRONICĂ

tains produits chimiques peuvent induire la lyse d'une fraction importante d'une population de bactéries lysogènes.

Nous connaissons à présent le phénomène à la base des observations de Lwoff. Une bactérie lysogène contient un prophage dont la présence protège la cellule de l'infection par un autre phage, ou **surinfection**, et qui est dupliqué et transmis aux cellules filles lors de la division. Chez une petite fraction des cellules lysogènes, le prophage est induit à produire des phages infectieux. Ce processus prive la cellule de son immunité ; elle lyse et libère les phages infectieux dans le milieu. Ceux-ci peuvent alors infecter toute bactérie non lysogène présente dans la culture.

Sur la base de ce phénomène, on peut ranger les phages dans deux catégories : ceux pour lesquels n'existent pas de bactéries lysogènes sont appelés **virulents** (il peut exister des mutants bactériens résistants à ces phages, mais l'origine de la résistance n'est pas la lysogénie). Les phages capables de lysogéniser des bactéries sont dits **tempérés.** Ces phages peuvent suivre un cycle lytique dans certaines conditions, mais fréquemment, ils suivent la voie lysogénique et s'installent dans la cellule sous forme de prophage. La résistance d'une bactérie lysogène à la surinfection est une «immunité» conférée par la présence du prophage qui se maintient pendant de nombreuses générations. Les phages tempérés provoquent la lyse lorsque le prophage est **induit** ou activé. La figure 10-26 présente un diagramme du cycle de vie d'un phage tempéré typique.

Message Les phages virulents ne peuvent subsister à l'état de prophage; ils provoquent toujours la lyse. Les phages tempérés peuvent se maintenir dans la cellule sous forme de prophages et leurs hôtes sont alors des bactéries lysogènes; ils sont aussi capables de lyser les bactéries tout de suite après l'infection ou après induction du phage.

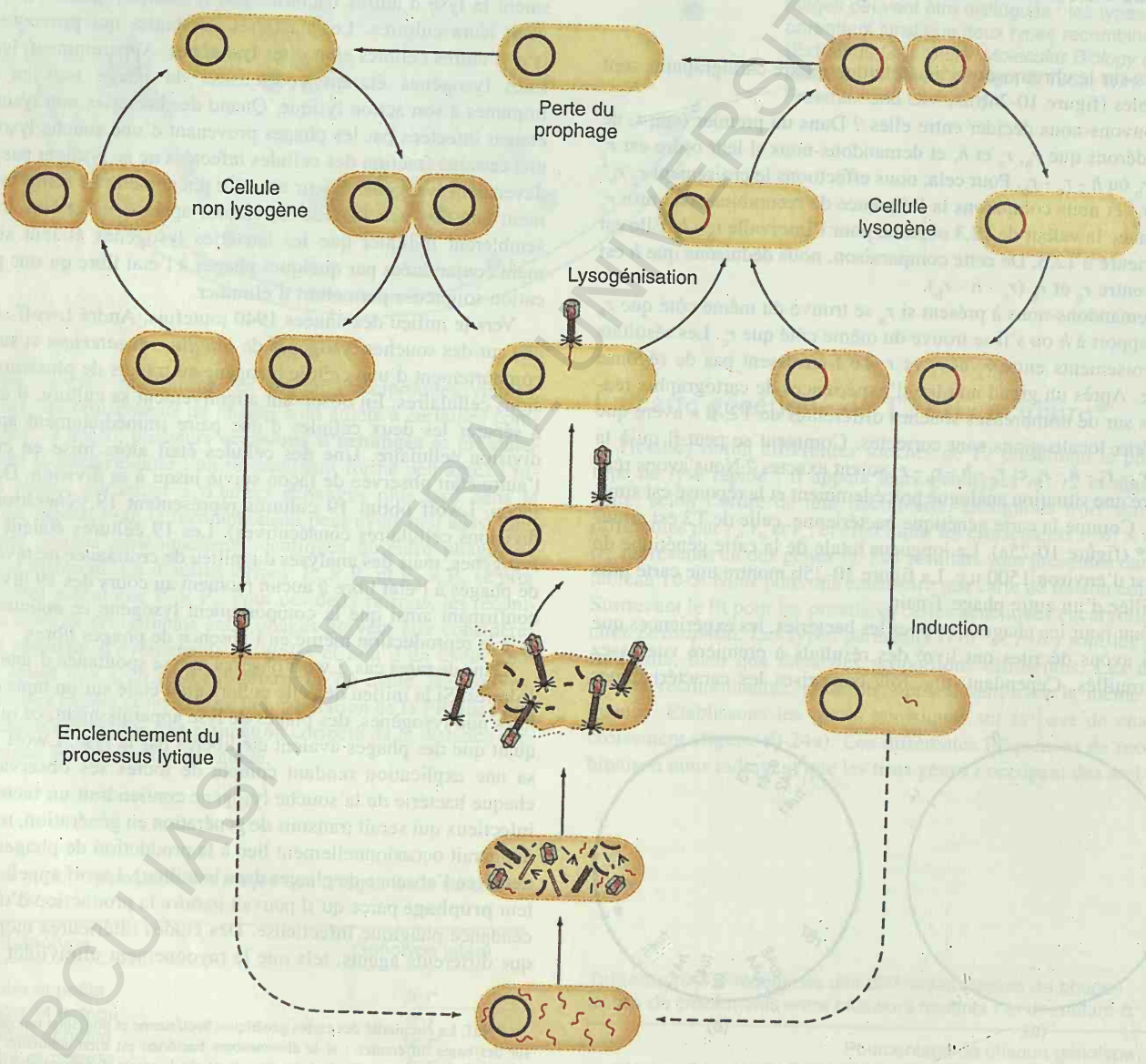


Figure 10-26. Les deux cycles cellulaires dans lesquels peuvent s'engager un phage tempéré et son hôte bactérien. (Extrait de A. Lwoff, *Bacteriological Reviews* 17, 269, 1953.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Le fondement génétique de la lysogénie

Quelle est la nature du prophage ? Après induction, le prophage est capable de commander la synthèse de phages matures, ce qui indique que tout le génome phagique doit être présent dans le prophage. Mais le prophage est-il une petite entité indépendante dans le cytoplasme – un plasmide, par exemple – ou est-il associé de quelque façon au génome bactérien ? Par le plus grand des hasards, la souche originale d'*E. coli* utilisée par Lederberg et Tatum (page 279) s'avéra être lysogène pour un phage tempéré appelé **lambda** (λ). λ est devenu le phage le plus intensivement étudié et le mieux caractérisé de tous les virus bactériens (figure 10-27). Les premiers croisements $F^+ \times F^-$ impliquant un partenaire lysogène donnèrent des résultats asymétriques : des croisements $F^+ \times F^-(\lambda)$ produisaient des cellules réceptrices lysogènes recombinantes, alors que les croisements réciproques $F^+(\lambda) \times F^-$ n'en produisaient presque jamais.

Ces résultats ne devinrent compréhensibles qu'après la découverte des souches Hfr. Lors d'un croisement Hfr $\times$ $F^-(\lambda)$, l'obtention d'exconjugants F^- lysogènes contenant des allèles provenant du Hfr ne présentait aucune difficulté. Par contre, si dans le croisement réciproque Hfr(λ) $\times$ F^-, les marqueurs proximaux du Hfr étaient retrouvés dans les exconjugants, il n'en allait pas de même pour les marqueurs plus distaux (transférés plus tardivement dans le croisement). En outre, ces croisements réciproques ne produisaient presque jamais d'exconjugants lysogènes. Comment expliquer cette absence de réciprocité? Les observations prenaient un sens si l'on considérait que le prophage de λ se comportait comme un locus génétique de la bactérie (c'est-à-dire comme faisant partie du chromosome bactérien). Dans une expérience de croisement interrompu avec un Hfr déterminé, le prophage de λ pénètre toujours dans la cellule F^- à un moment précis et en liaison étroite avec le locus *gal*. Nous pouvons donc attribuer un locus spécifique au prophage de λ, à côté du locus *gal*.

Lors du croisement d'un Hfr lysogène avec une F^- non lysogène, l'entrée du prophage de λ dans le cytoplasme d'une cellule non lysogène déclenche immédiatement l'engagement du prophage dans un cycle lytique ; ce phénomène est appelé **induction zygotique.** La pénétration du prophage dans une cellule F^- non immune déclenche immédiatement le cycle lytique. Par contre, quand deux souches lysogènes sont croisées entre elles — Hfr(λ) $\times$ $F^-(\lambda)$ —, l'obtention de recombinants pour des marqueurs distaux ne présente pas de problème (il n'y a pas d'induction zygotique) (figure 10-28). En ce qui concerne ce phénomène, le cytoplasme des F^- semble donc présenter deux états selon que la cellule contienne ou non un prophage de λ. Nous savons maintenant que le prophage spécifie la synthèse d'un facteur cytoplasmique qui réprime la multiplication du virus. La pénétration du prophage dans un environnement non lysogène diluerait immédiatement ce facteur répresseur, ce qui entraînerait la multiplication du virus. Mais si le virus spécifie la synthèse d'un facteur répresseur de sa multiplication, pourquoi ne se réprime-t-il pas lui-même à nouveau? Il le fait puisqu'une fraction des cellules infectées deviennent elles-mêmes lysogènes. Il y a compétition entre les signaux des gènes de λ spécifiant la multiplication du phage et ceux provoquant son blocage. L'hypothèse d'un répresseur spécifié par le phage et présent dans le cytoplasme des bactéries lysogènes fournit une explication élégante de leur immunité : tout phage surinfectant rencontrerait immédiatement un répresseur et serait inactivé. Nous examinerons ce type de modèle plus en détail au chapitre 18.

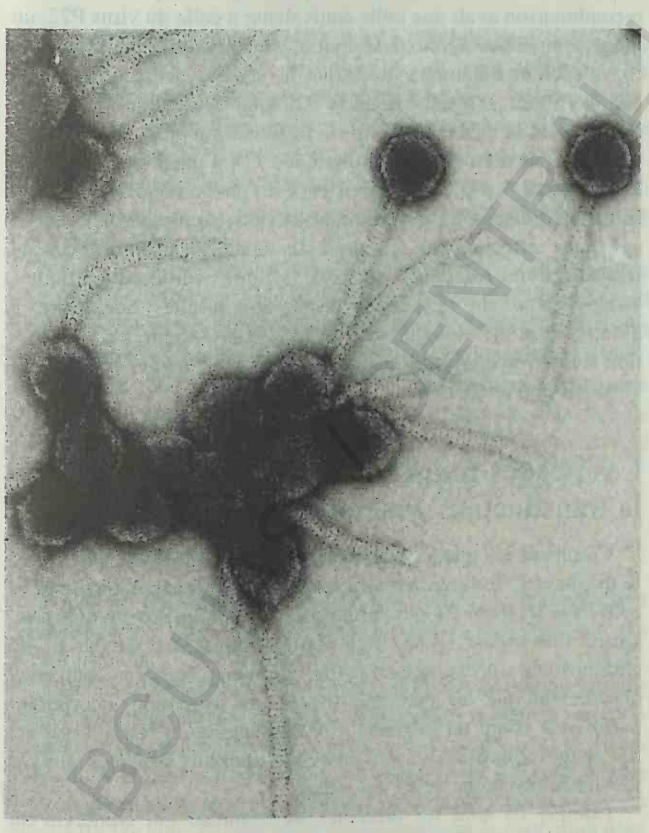


Figure 10-27. Photo de phages λ vus au microscope électronique. (Communiquée par Jack D. Griffith.)

L'attachement du prophage

Comment le prophage s'attache-t-il au génome bactérien? Allan Campbell proposa en 1962 que λ s'attache au chromosome bactérien par un crossing-over entre son chromosome qui serait circulaire et le chromosome circulaire d'*E. coli* (figure 10-29). Le

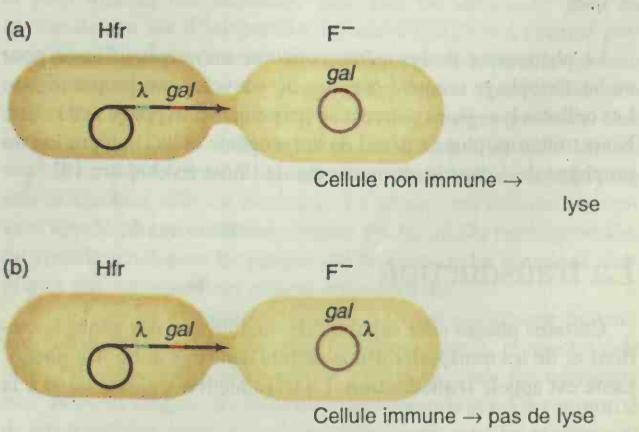


Figure 10-28. L'induction zygotique

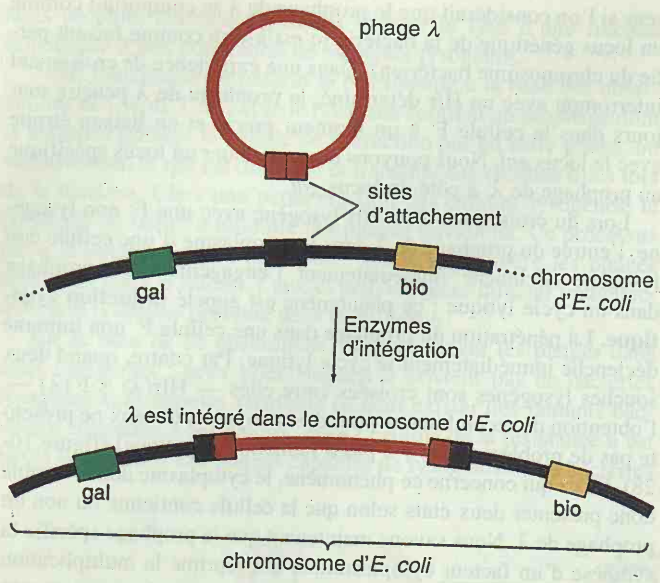


Figure 10-29. Modèle de Campbell pour l'intégration du phage λ dans le chromosome d'*E. coli*. Une recombinaison réciproque s'effectue entre un site d'attachement spécifique présent sur l'ADN circularisé de λ et un site spécifique situé entre les gènes *gal* et *bio* du chromosome bactérien.

crossing-over se produirait au niveau d'un site spécifique du chromosome de λ, appelé **site d'attachement de λ**, et un site du chromosome bactérien situé entre les loci *gal* et *bio*.

Outre sa simplicité, un des aspects attrayants du modèle de Campbell pour expliquer la lysogénie est qu'il permet de formuler une série de prédictions testables par les généticiens de λ :

1. L'intégration physique du prophage devrait accroître la distance génétique entre les marqueurs génétiques bactériens flanquant son point d'insertion et cela a été observé pour les loci *gal* et *bio* (figure 10-29). De fait, ces distances, mesurées par temps d'entrée ou par recombinaison, *sont* accrues par la lysogénisation.
2. Certaines délétions de segments du chromosome bactérien adjacents au site du prophage devraient également détruire des gènes phagiques. Des expériences ont confirmé cette prédiction.

Le phénomène de lysogénie constitue un moyen efficace pour un bactériophage tempéré d'éviter de «dévorer son propre logis». Les cellules lysogènes peuvent se perpétuer, et le phage avec elles. Nous traiterons plus en détail de la lysogénie et de l'intégration du prophage de λ dans le chromosome de l'hôte au chapitre 18.

La transduction

Certains phages sont capables de «mobiliser» des gènes bactériens et de les transporter d'une cellule dans une autre. Ce phénomène est appelé **transduction**. La transduction s'ajoute donc à la palette des modes de transfert génétique entre bactéries qui comprenait déjà la conjugaison, le transfert infectieux d'épisomes et la transformation.

Il existe deux types de transduction : généralisée et spécialisée. Dans la transduction généralisée, les phages peuvent transporter n'importe quelle région du génome; la transduction **spécialisée** est effectuée par des phages qui transfèrent des parties bien spécifiques du chromosome bactérien.

La découverte de la transduction

En 1951, Joshua Lederberg et Norton Zinder appliquèrent à l'étude de la recombinaison chez la bactérie *Salmonella typhimurium* les méthodes qui s'étaient avérées efficaces dans le cas d'*E. coli*. Ils utilisèrent deux souches différentes : l'une était *phe⁻ trp⁻ tyr⁻*, l'autre *met⁻ his⁻*. (Ne nous préoccupons pas de la nature exacte de ces marqueurs, si ce n'est pour préciser que les allèles mutants confèrent des exigences nutritionnelles.) Quand l'une ou l'autre de ces souches était étalée sur milieu minimum, aucune cellule de type sauvage n'apparaissait. Par contre, s'ils étalaient un mélange des deux souches, des recombinants sauvages apparaissaient avec une fréquence de 1 sur 10^5. La situation semblait donc analogue à celle observée chez *E. coli*.

Par contre, Lederberg et Zinder récupérèrent également des recombinants lors d'une expérience dans un tube en U, dans laquelle le contact entre cellules des deux souches (donc la conjugaison) était rendu impossible par la présence d'un filtre. En faisant varier le diamètre des pores du filtre séparant les deux branches du tube, ils établirent que l'agent responsable de la recombinaison avait une taille équivalente à celle du virus P22, un phage tempéré de *Salmonella* dont on connaissait déjà l'existence. Ils relevèrent d'autres indices que le vecteur de recombinaison était bien P22. L'agent filtrant et P22 étaient identiques en taille, présentaient la même sensibilité à un antisérum et la même immunité vis-à-vis d'enzymes hydrolytiques. C'est ainsi que Lederberg et Zinder, au lieu d'établir l'existence du phénomène de conjugaison chez *Salmonella*, découvrirent un nouveau mode de transfert génétique effectué par un virus. Ils appelèrent ce phénomène **transduction**. Au cours du cycle lytique, certaines particules virales emportent des gènes bactériens qu'elles transfèrent à d'autres bactéries lorsqu'elles les infectent. Depuis, la transduction s'est avérée un phénomène très répandu chez les phages tant virulents que tempérés.

Les phages transducteurs et la transduction généralisée

Comment les phages transducteurs sont-ils formés ? En 1965, K. Ikeda et J. Tomizawa réalisèrent une série d'expériences sur le coliphage tempéré P1 qui permirent de répondre à cette question. Quand une cellule «donneuse» non lysogène est lysée par P1, le chromosome est dégradé en petits fragments. Ikeda et Tomizawa observèrent que les particules virales en formation incorporent parfois par erreur un fragment d'ADN bactérien. C'est là l'origine des phages transducteurs. Un processus similaire peut être observé lorsque le prophage de P1 est induit.

Comme ce sont les protéines du manteau qui confèrent au phage la capacité d'attaquer les cellules, de tels virus, ou particules

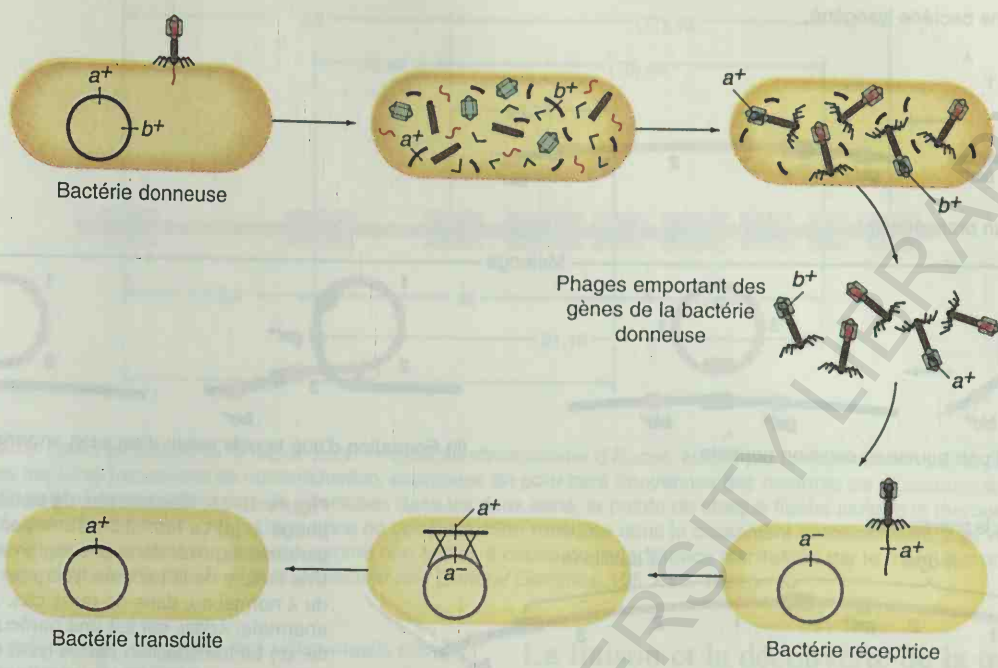


Figure 10-30. Le mécanisme de la transduction généralisée. En situation réelle, seule une minorité (1 sur 10000) des phages produits par l'infection du donneur emportent des gènes bactériens.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI BIOLOGIE

transductrices, peuvent s'attacher à une cellule bactérienne et y injecter l'ADN qu'elles contiennent et qui, en l'occurrence, se trouve contenir des gènes de la bactérie donneuse. Un mérodiploïde est ainsi formé dans lequel les gènes transduits peuvent être incorporés dans le chromosome par recombinaison (figure 10-30). Tout marqueur de la bactérie-hôte donneuse peut se trouver transduit de la sorte, c'est pourquoi on qualifie de **généralisée** ce type de transduction.

P1 et P22 appartiennent au groupe des phages qui effectuent la transduction généralisée (c'est-à-dire qui transfèrent virtuellement tous les gènes du chromosome de l'hôte). Quant aux prophages correspondants, celui de P22 s'intègre probablement dans le chromosome de l'hôte, tandis que celui de P1 se maintient à l'état libre comme un grand plasmide. Leur capacité transductrice découle dans chaque cas de l'encapsidation fortuite d'ADN bactérien lors de la lyse.

La transduction spécialisée

Penchons-nous à présent sur le phénomène de **transduction spécialisée** par lequel seuls certains marqueurs de l'hôte peuvent être transduits.

Lambda (λ) constitue un bon exemple de transducteur spécialisé. Le prophage de λ s'intègre toujours entre la région *gal* et la région *bio* du chromosome d'*E. coli*. Lors d'expériences de transduction, λ ne peut transduire que la région *gal* ou une autre région proche, *bio*. Examinons le mécanisme de la transduction par λ. La figure 10-31a nous montre de façon schématique la formation d'un lysogène. La recombinaison entre les régions homologues des chromosomes de λ et de la bactérie est catalysée par un système enzymatique spécifique qui sera décrit au chapitre 20. Les régions d'intégration du phage et de la bactérie ne sont pas complètement identiques, de sorte que l'intégration de λ produit deux sites hybrides. Nous pouvons déclencher le cycle lytique en irradiant les cellules lysogènes aux rayons ultraviolets et obtenir ainsi un lysat (une population de phages issus du prophage). L'excision normale du prophage après formation d'une boucle (en anglais, «looping out») reconstitue le site d'intégration du phage (figure 10-31b, i). Lors de l'infection de bactéries non lysogènes pour λ, ces phages pourront s'intégrer normalement dans le chromosome (figure 10-31a).

De très rares cas d'excision anormale produiront des phages qui emporteront les gènes *gal* (figure 10-31b, ii). De telles particules sont **déficientes** parce que certains des gènes de λ sont restés dans le chromosome de l'hôte ; on les désigne dès lors *λdgal* (λ-déficient *gal*). Une particule *λdgal* possède une enveloppe de phage λ et peut infecter des bactéries, mais elle est déficiente aussi au niveau de son site d'intégration. Le site d'intégration hybride présent dans *λdgal* constitue un très mauvais substrat pour le système enzymatique spécifique du phage qui permet à la recombinaison entre sites d'intégration phagique et bactérien de se produire. Dès lors, l'intégration de *λdgal* est très peu efficace lorsqu'il infecte seul *E. coli*. Toutefois, la co-infection avec un λ sauvage permet une intégration efficace de *λdgal*. Le phage co-infectant est souvent appelé **phage auxiliaire** (figure 10-31c,i). De façon générale, on appelle auxiliaires les phages qui fournissent les fonctions phagiques qui manquent aux phages transducteurs.

Si le lysat de λ original (figure 10-31b) est utilisé pour infecter une culture de bactéries *gal*$^-$ non lysogènes pour λ, et que les cellules infectées sont étalées sur un milieu où seuls les transduits *gal*$^+$ peuvent croître, de rares colonies apparaîtront. Une minorité de ces transduits provient de la recombinaison entre les régions *gal* du *λdgal* et du chromosome de l'hôte (figure 10-31c, ii). La majorité des transduits est constituée de doubles lysogènes (figure 10-

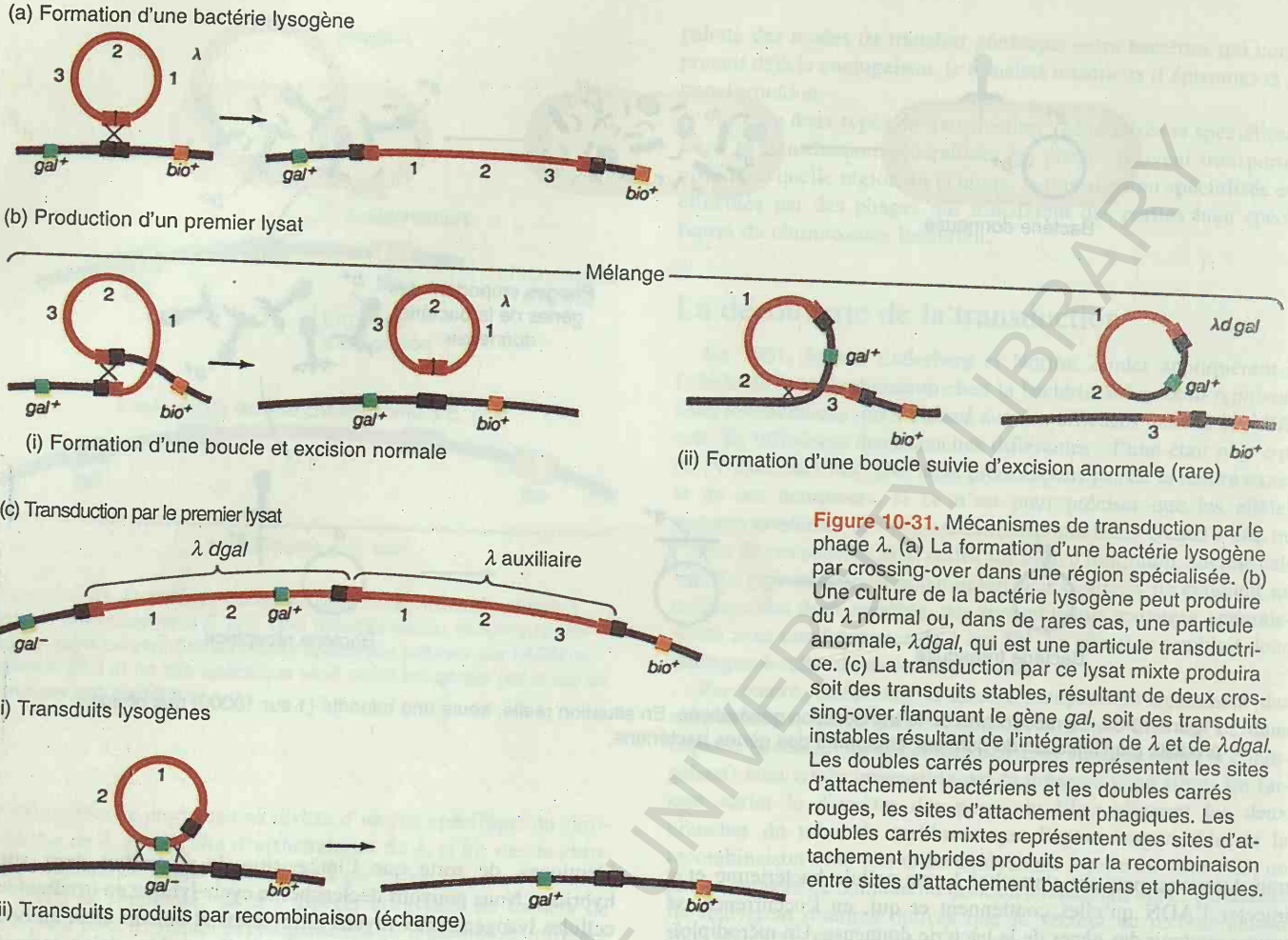


Figure 10-31. Mécanismes de transduction par le phage λ. (a) La formation d'une bactérie lysogène par crossing-over dans une région spécialisée. (b) Une culture de la bactérie lysogène peut produire du λ normal ou, dans de rares cas, une particule anormale, *λdgal*, qui est une particule transductrice. (c) La transduction par ce lysat mixte produira soit des transduits stables, résultant de deux crossing-over flanquant le gène *gal*, soit des transduits instables résultant de l'intégration de λ et de *λdgal*. Les doubles carrés pourpres représentent les sites d'attachement bactériens et les doubles carrés rouges, les sites d'attachement phagiques. Les doubles carrés mixtes représentent des sites d'attachement hybrides produits par la recombinaison entre sites d'attachement bactériens et phagiques.

31c, i). Si un double lysogène est mis en culture, puis induit à lyser et que le lysat est utilisé pour transduire *gal*$^+$, la fréquence de transduction sera cette fois très élevée. Un tel lysat est appelé un **lysat à haute fréquence de transduction (HFT)**. Ces lysats HFT contiennent une proportion importante de phages transducteurs spécialisés (dans le cas présent, de *λdgal*), puisque chaque lysogène contenait un prophage transducteur, et que leur induction a entraîné l'excision et la propagation simultanée du phage défectif transducteur et du phage auxiliaire. Ceci contraste avec l'induction du lysogène initial (figure 10-31a) qui n'a produit des phages *λdgal* qu'avec une fréquence très faible (figure 10-31b, i).

La transduction spécialisée ne mobilise que les courtes régions du génome bactérien qui flanquent le prophage. La transduction par λ peut mobiliser les gènes *gal* ou *bio*. La transduction spécialisée est donc utile pour transférer des gènes spécifiques d'une souche dans une autre.

Cartographie par transduction

La transduction généralisée permet de mesurer la liaison entre des gènes bactériens qui sont suffisamment proches que pour être présents ensemble sur le fragment d'ADN encapsidé et transduit par un phage. Par exemple, supposons que nous désirions mesurer la liaison entre les loci *met* et *arg* chez *E. coli*. Nous pourrions faire recombiner une souche *met*$^+$ *arg*$^+$ avec une souche *met*$^-$ *arg*$^-$. Nous ferions croître le phage P1 par infection de la souche *met*$^+$ *arg*$^+$, puis nous infecterions la souche *met*$^-$ *arg*$^-$ avec les phages ainsi produits et nous sélectionnerions les colonies *met*$^+$. Nous pourrions alors déterminer le pourcentage de colonies *met*$^+$ qui sont aussi devenues *arg*$^+$. Les souches transduites à la fois vers *met*$^+$ et *arg*$^+$ ont été **co-transduites.**

La liaison est généralement exprimée en fréquences de co-transduction (figure 10-32). La fréquence de co-transduction est d'autant plus grande que plus les marqueurs sont plus proches.

Nous pouvons estimer la taille du fragment de chromosome de l'hôte qu'un phage peut emporter par une expérience du type de celle que voici, où c'est le phage P1 qui est utilisé :

donneuse *leu*$^+$ *thr*$^+$ *azi*^{r} → réceptrice *leu*$^-$ *thr*$^-$ *azi*^{s}

Nous sélectionnons la présence dans la souche réceptrice d'un ou plusieurs marqueurs de la souche donneuse puis, dans la plus pure tradition de la génétique mérozygotique, nous examinons ces

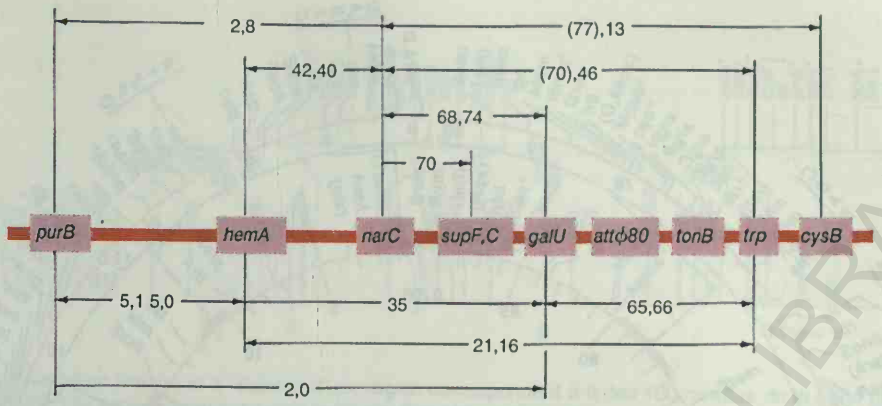
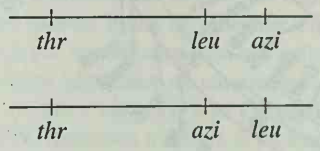
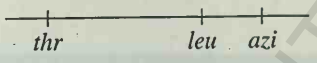


Figure 10-32. Carte génétique de la région *purB* → *cysB* du chromosome d'*E. coli*, établie par cotransduction par le phage P1. Les chiffres sont des fréquences de cotransduction, exprimées en pour cent (moyennes des mesures de plusieurs expériences). Quand les transductions ont été effectuées dans les deux sens, la pointe de chaque flèche indique le marqueur sélectionné, et le nombre le plus proche, la fréquence de cotransduction mesurée dans le croisement correspondant. Les valeurs mises entre parenthèses sont considérées comme non fiables à cause de l'interférence manifestée par le marqueur non sélectionné. (Redessiné à partir de J.R. Guest, *Molecular and General Genetics*, 105, 285, 1969.)

transduits pour la présence de marqueurs non sélectionnés, comme indiqué au tableau 10-4. L'expérience 1 nous indique que *leu* est assez proche de *azi* et éloigné de *thr*, ce qui nous laisse le choix entre les deux organisations que voici :



L'expérience 2 nous montre que *leu* est plus proche de *thr* qu'*azi*, de sorte que la carte doit être



En sélectionnant à la fois *thr*$^+$ et *leu*$^+$, comme dans l'expérience 3, nous voyons que les fragments transduits correspondants ne portent jamais le locus *azi*. En étudiant suffisamment de marqueurs, de façon à établir une carte génétique plus complète, il devient possible d'estimer la taille d'un fragment transduit. P1 cotransduit des gènes compris dans un intervalle correspondant à environ 1,5 min sur la carte du chromosome d'*E. coli* (1 min, ou minute, est la longueur de la portion de chromosome transférée par un Hfr en l'espace d'une minute, à 37°C).

NdT. La taille des fragments transduits correspond donc à environ 1,5 % de la longueur du chromosome bactérien, si l'on se réfère à la carte de la figure 10-33.

Tableau 10-4. Sort de marqueurs non sélectionnés dans une série de transductions par P1

Expérience	Marqueur(s) sélectionné(s)	Marqueurs non sélectionnés
1	*leu*$^+$	50 % sont *azi*^{r} ; 2 % *thr*^{r}
2	*thr*$^+$	3 % sont *leu*$^+$; 0 % *azi*^{r}
3	*leu*$^+$ et *thr*$^+$	0 % sont *azi*^{r}

La liaison et la découverte de la transduction

Vous pourriez vous demander à présent comment il fut possible à Lederberg et Zinder d'obtenir des transduits prototrophes avec leurs souches à marqueurs nutritionnels multiples. Une souche était auxotrophe pour la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine, l'autre pour la méthionine et l'histidine. Avec ce que nous savons maintenant de la transduction généralisée par P1 et P22, nous ne nous attendrions pas à ce qu'elles puissent redevenir prototrophes, à moins que les gènes ne soient suffisamment proches que pour être transportés par la même particule transductrice. Et ce fut précisément le cas dans leur expérience. La souche *his*$^-$*met*$^-$ était la source de phage transducteur P22. Elle donnait donc les allèles sauvages qui allaient remplacer les allèles *phe*$^-$ *trp*$^-$ *tyr*$^-$. Ces gènes appartiennent à la même voie métabolique et sont étroitement liés. (En fait, nous savons maintenant que l'auxotrophie pour la phénylalanine et celle pour la tyrosine résultent de la même mutation ; l'auxotrophie pour le tryptophane est due à une mutation dans un autre gène.) Si Lederberg et Zinder avaient utilisé d'autres marqueurs, ils n'auraient peut-être jamais découvert la transduction !

Message La transduction est la conséquence de l'incorporation fortuite de gènes de l'hôte bactérien dans des particules phagiques en cours d'assemblage et de leur transfert dans d'autres cellules bactériennes. Dans le cas de la **transduction généralisée**, lors de l'empaquetage de l'ADN dans les têtes des phages en formation, les particules transductrices incorporent un fragment de chromosome bactérien. Ce phénomène se produit au cours du cycle lytique de certains phages virulents ou tempérés, ou lors de l'induction de certains phages tempérés lysogéniques. La **transduction spécialisée** débute toujours par l'induction d'un prophage. Elle est une conséquence de l'excision fautive du prophage et la particule transductrice contient à la fois des gènes bactériens et phagiques. Le phage transducteur spécialisé ne transduit que quelques gènes spécifiques de l'hôte parce que le prophage d'un phage tempéré s'insère normalement à un site précis du chromosome bactérien.

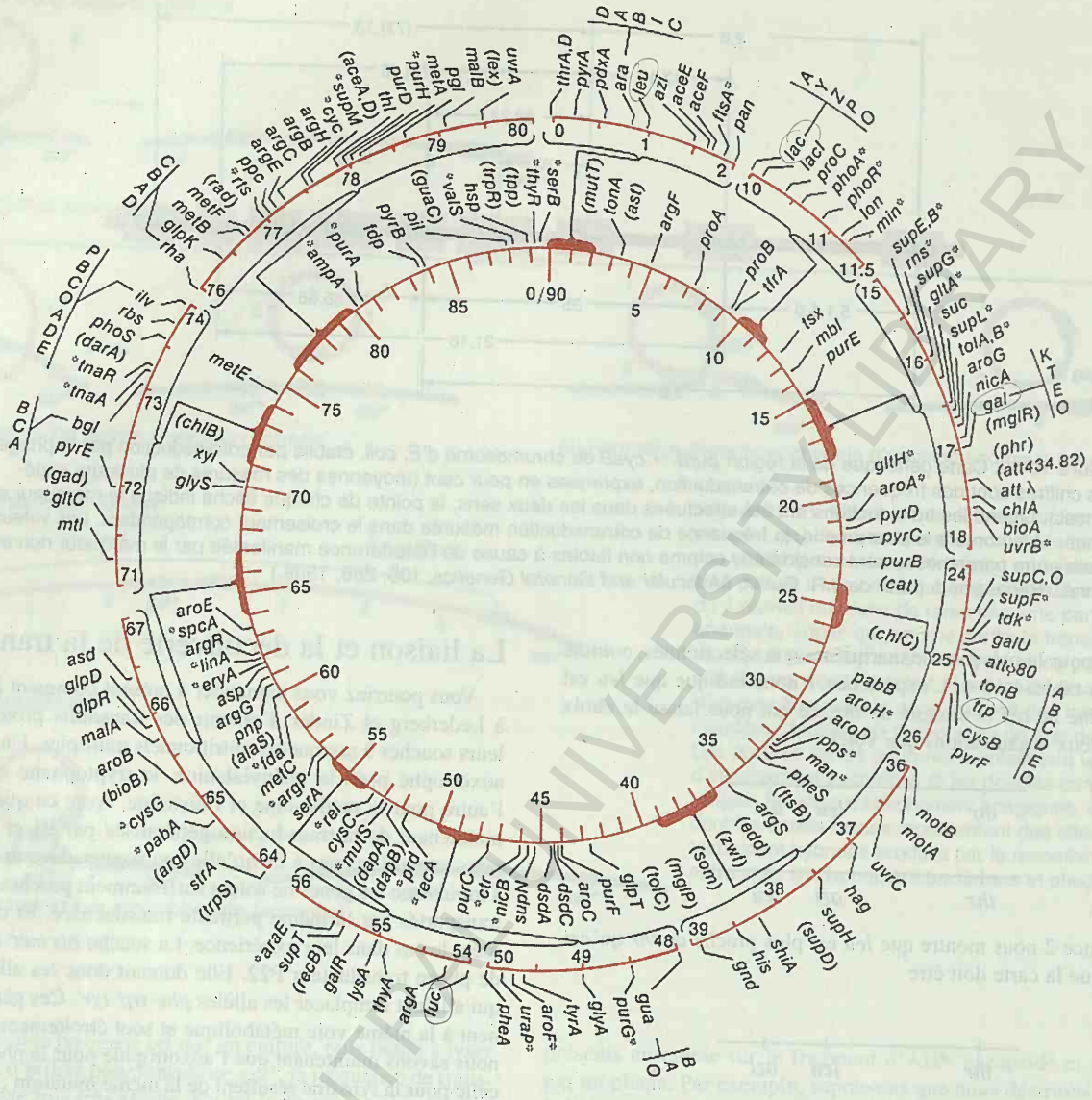


Figure 10-33. La carte génétique d'*Escherichia coli* (version 1963). Les unités sont des minutes (comptées au départ d'une origine définie arbitrairement). (Extrait de G.S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses* Copyright © 1963, W.H. Freeman and Company.)

La cartographie des chromosomes bactériens

Des cartes très détaillées du chromosome de plusieurs bactéries ont été établies en combinant les techniques de croisement interrompu, de cartographie par mesure de fréquences de recombinaison, de transformation et de transduction. De nos jours, un marqueur génétique nouveau est tout d'abord localisé dans un secteur de chromosome correspondant à 10 à 15 minutes en utilisant une batterie de souches Hfr aux origines de transfert différentes. Ceci permet de choisir ensuite une série de marqueurs dont la localisation au sein de cet intervalle est connue, et qui seront utilisés dans des expériences de cotransduction par le phage P1. La complexité de la carte du chromosome d' *E. coli*, telle qu'établie en 1963 et qui donnait la position d'environ 100 gènes illustrait déjà la puissance et la sophistication de ce type d'analyse génétique (figure 10-33). Après 27 années d'analyse et de raffinement, la carte décrivait, en 1990, la position de plus de 1400 gènes! La figure 10-34 montre une portion correspondant à cinq minutes de la carte de 1990 (qui est divisée en 100 minutes). La complexité et le raffinement de cette carte illustrent la puissance et la sophistication de l'analyse génétique pratiquée à son plus haut niveau.

Le transfert génétique chez les bactéries – une synthèse

1. Le transfert de gènes entre bactéries s'effectue par conjugaison, par transformation et par transduction virale.
2. L'acquisition de marqueurs génétiques, quel que soit le mode de leur transfert — conjugaison avec une souche Hfr, transformation par un fragment du chromosome d'une souche donneuse ou transduction généralisée —, dépend toujours de la réalisation d'une étape critique : le fragment d'ADN introduit dans la cellule réceptrice doit être incorporé dans le génome de celle-ci, le plus souvent à la suite d'un double crossing-over, pour être

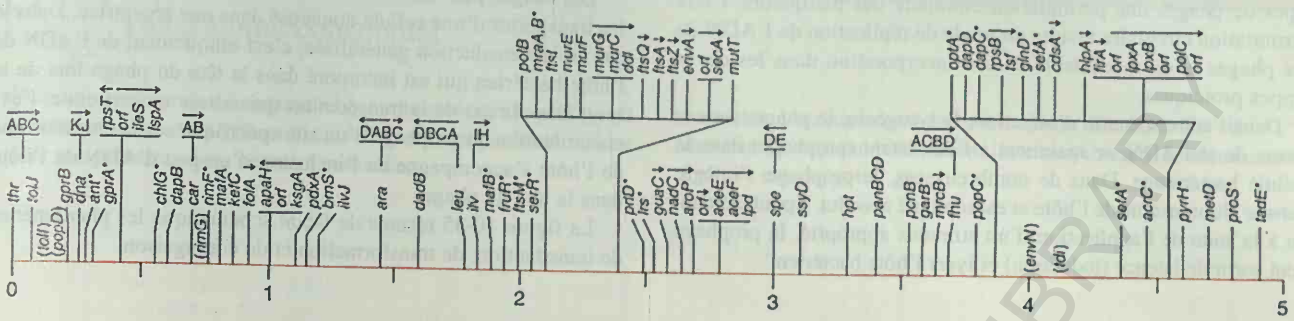


Figure 10-34. Représentation linéaire et à l'échelle d'une région correspondant à 5 des 100 minutes de la carte génétique d'*E. coli* K12 (version 1990). Les parenthèses autour du symbole d'un gène indiquent une incertitude quant à sa position. Un astérisque indique un marqueur localisé de façon plus précise, mais dont la position exacte n'est pas connue. Les flèches au-dessus de gènes ou de groupes de gènes indiquent leur sens de transcription . (Extrait de B.J. Bachmann, «Linkage Map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8»,*Microbiological Reviews,* 54, 130-197, 1990.)

acquis de façon héréditaire. Des fragments non incorporés ne sont pas répliqués et sont perdus par dilution dans la population des cellules filles.

3. Le transfert par conjugaison de facteurs F' porteurs de gènes bactériens et la transduction spécialisée de certains gènes présentent certaines similitudes en ce sens que dans chacun de ces phénomènes, un nombre limité de gènes bactériens déterminés est introduit de façon très efficace dans une cellule réceptrice et que leur acquisition héréditaire ne requiert pas de recombinaison «normale» comme c'est le cas pour l'acquisition de simples fragments d'ADN. Après son transfert, le facteur F' est répliqué de façon autonome dans le cytoplasme de la souche réceptrice. Quant à l'ADN du phage transducteur spécialisé, il s'intègre dans le chromosome bactérien grâce à un système de recombinaison qui lui est propre. Dans les deux cas, un diploïde partiel (mérodiploïde) est formé, chacun des phénomènes permettant à la souche réceptrice d'hériter des gènes transférés tout en conservant les allèles qui lui étaient propres.
4. Le transfert de gènes peut être utilisé pour dresser une carte du chromosome. Des croisements avec des Hfr permettent d'abord de localiser une mutation dans une région du chromosme. La transduction généralisée sert ensuite à localiser finement la mutation.

RÉSUMÉ

Les découvertes dans le domaine de la génétique microbienne au cours des quatre décennies écoulées ont jeté les bases des progrès spectaculaires récents de la biologie moléculaire (que nous aborderons dans plusieurs des chapitres suivants). Tout au début de cette période, le transfert de gènes et la recombinaison entre bactéries de types conjugants différents furent mis en évidence chez plusieurs espèces. Ce transfert est unidirectionnel et s'effectue d'une cellule donneuse (F^+ ou Hfr) vers une cellule réceptrice (F^-). La faculté de transférer du matériel génétique est conférée aux cellules donneuses par la présence dans la cellule d'un facteur de fertilité (F) qui a les propriétés d'un épisome.

Ce facteur F, qui se maintient de façon autonome dans le cytoplasme des souches F^+, s'intègre parfois dans le chromosome bactérien et provoque la formation d'une souche Hfr. Une telle souche transfère des gènes chromosomiques et une recombinaison entre ceux-ci et leurs homologues sur le chromosome de la souche réceptrice s'ensuit. Le facteur F peut s'intégrer en plusieurs sites du chromosome bactérien. Grâce à cela, les généticiens purent démontrer la circularité du chromosome d'*E. coli*. L'interruption à intervalles de temps précis du transfert chromosomique entre bactéries a fourni aux généticiens une méthode originale et spécifique pour établir la carte de liaison du chromosome unique d'*E. coli* et d'autres bactéries apparentées.

Des caractères génétiques peuvent également être transmis entre bactéries simplement en utilisant de l'ADN purifié. Ce phénomène de transformation de cellules bactériennes constitua la première démonstration que l'ADN est le matériel génétique. Pour que la transformation ait lieu, il faut que l'ADN soit capturé dans le milieu ambiant par la cellule réceptrice et qu'une recombinaison se produise entre son chromosome et l'ADN incorporé.

Les bactéries, elles aussi, sont sujettes à des maladies virales, causées par les bactériophages. L'infection par des phages peut suivre deux scénarios. Le chromosome phagique injecté dans la cellule bactérienne peut subvertir la machinerie métabolique de la cellule infectée en l'engageant dans la production d'une population de phages (les «descendants» du phage infectant) qui lyseront l'hôte bactérien. Une fois libérés, ces nouveaux phages peuvent infecter d'autres cellules. Quand deux phages de génotypes différents infectent une même bactérie, une recombinaison entre leurs chromosomes peut se produire pendant le déroulement du cycle lytique. La cartographie génétique réalisée sur base de cette recombinaison entre chromosomes phagiques a révélé chez plusieurs

types de phages une permutation circulaire des marqueurs. Cette permutation circulaire résulte du mode de réplication de l'ADN de ces phages et du mécanisme de son incorporation dans les enveloppes protéiques.

Dans l'autre scénario d'infection, la lysogénie, le phage, sous la forme de son ADN, se maintient à l'état latent (prophage) dans la cellule bactérienne. Dans de nombreux cas, le prophage s'intègre dans le chromosome de l'hôte et est répliqué avec lui. Spontanément ou à la suite de l'application d'un stimulus approprié, le prophage peut sortir de latence (induction) et lyser l'hôte bactérien.

Les phages peuvent servir de vecteurs à des gènes bactériens et les transporter d'une cellule donneuse dans une réceptrice. Dans le cas de la transduction généralisée, c'est uniquement de l'ADN de l'hôte bactérien qui est incorporé dans la tête du phage lors de la lyse. Dans le cas de la transduction spécialisée ou restreinte, l'excision fautive du prophage d'un site spécifique sur le chromosome de l'hôte s'accompagne de l'inclusion d'un peu d'ADN de l'hôte dans la tête du phage.

La figure 10-35 résume de façon schématique les phénomènes de transduction, de transformation et de conjugaison.

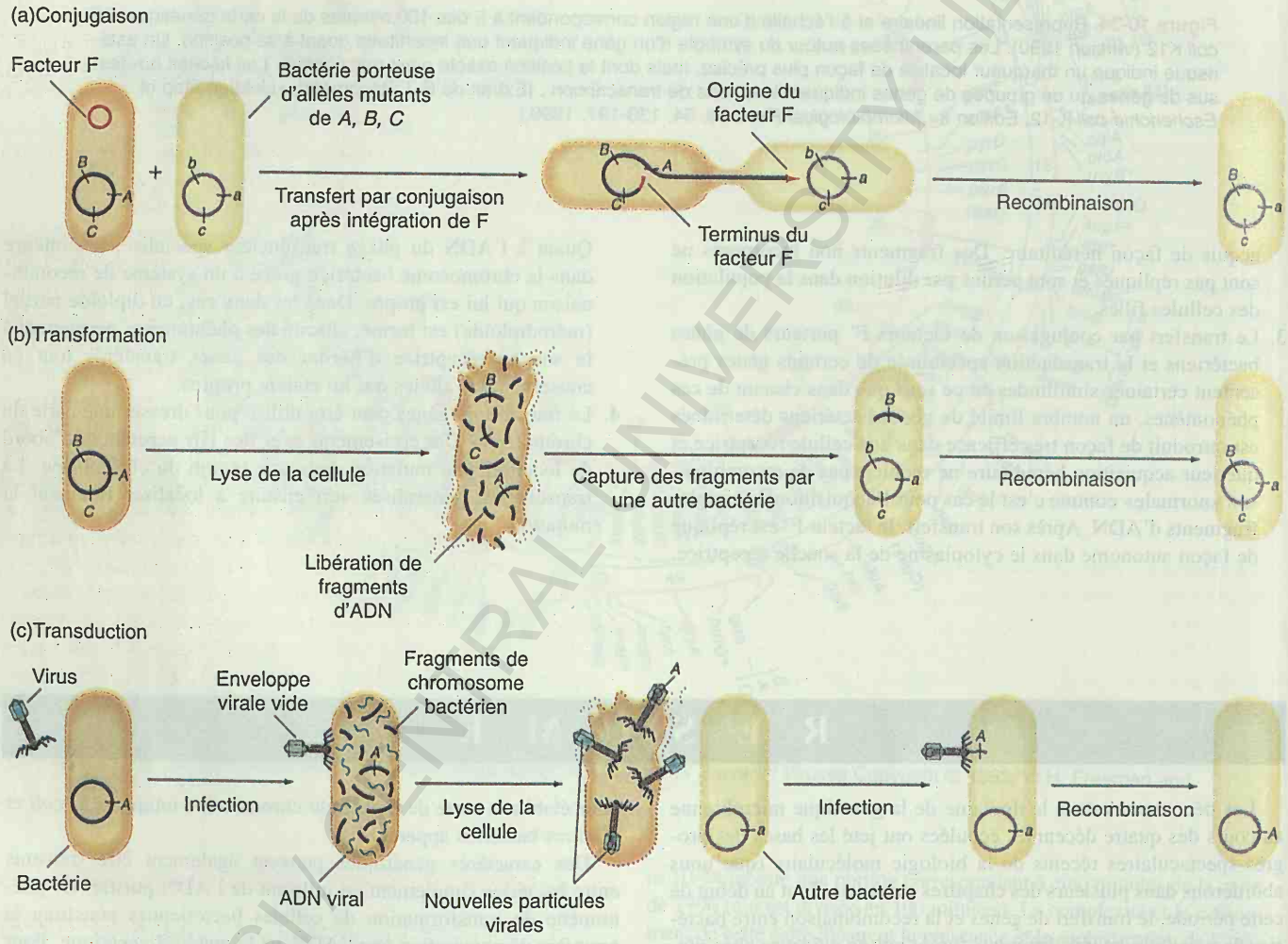


Figure 10-35. La recombinaison chez les bactéries requiert l'introduction dans la cellule d'un allèle provenant d'une autre cellule. (a) Dans la conjugaison, un élément cytoplasmique tel que le facteur de fertilité F est intégré dans le chromosome bactérien. Lors d'un contact entre cellules, le facteur intégré dirige le transfert de tout ou partie du chromosome dans l'autre cellule dont le chromosome porte des allèles des gènes du chromosome transféré. Le segment transféré peut recombiner avec la région homologue du chromosome de la cellule réceptrice. Dans l'exemple montré ici, l'allèle *B* remplace l'allèle *b*. (b) Dans la transformation, un fragment d'ADN porteur d'un allèle particulier est capturé dans le milieu environnant par une cellule dont le chromosome porte un allèle correspondant; les allèles en question (ici, *B* et *b*) sont échangés par recombinaison. (c) après qu'un phage ait infecté une cellule bactérienne, un fragment d'ADN bactérien est encapsidé dans une des particules virales nouvellement formées. Quand cette particule virale infecte une autre cellule, elle injecte le fragment d'ADN bactérien qui recombine avec la région homologue du chromosome de la deuxième bactérie. Les allèles correspondants sont échangés (*A* et *a* dans notre exemple).

BIOLOGICAL UNIVERSITY LIBRARY

Diagramme conceptuel

Dessinez un diagramme conceptuel qui relie entre eux le plus grand nombre possible des termes suivants. Remarquez que les termes ne sont pas présentés dans un ordre particulier.

bactéries / conjugaison / recombinaison / Plasmide F / Hfr / F^- / donneur / récepteur / croisement interrompu / carte du chromosome / pilus / mérozygote / gène

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Nous avons vu au chapitre 5 que la recombinaison s'effectue par la cassure et la religature de chromosomes. Supposez qu'une cellule soit incapable d'effectuer cette cassure et religature à la suite d'une déficience de son système de recombinaison généralisée (elle est *rec*$^-$). Que se passerait-il lorsqu'une telle souche sert de réceptrice dans la transduction généralisée et dans la transduction spécialisée? Comparez d'abord chaque type de transduction, puis expliquez l'effet de la mutation *rec*$^-$ sur l'acquisition des gènes transduits dans chacun des processus.

Solution

La transduction généralisée résulte de l'incorporation de fragments de chromosome dans des capsides de phage, puis de l'infection de bactéries réceptrices par les particules phagiques transductrices. Les fragments chromosomiques sont incorporés de façon aléatoire dans les capsides phagiques, de telle sorte que n'importe quel marqueur du chromosome bactérien peut être transduit dans une autre souche par la transduction généralisée. Au contraire, la transduction spécialisée implique que l'ADN du phage s'intègre à un site précis du chromosome et que des marqueurs chromosomiques proches de ce site soient incorporés avec une faible fréquence dans le génome du phage. Par conséquent, seuls les marqueurs proches du site d'intégration du prophage pourront être transduits.

L'acquisition des marqueurs suit des voies différentes dans la transduction généralisée et dans la transduction spécialisée. Un phage transducteur généraliste injecte un fragment du chromosome de la souche donneuse dans la souche réceptrice. Ce fragment doit être incorporé par recombinaison dans le chromosome de la souche réceptrice, grâce à l'action du système de recombinaison généralisée. Par conséquent, une souche réceptrice *rec*$^-$ ne pourra incorpore les fragments d'ADN transduits et ne pourra acquérir des marqueurs par transduction généralisée. Par contre, la voie principale d'acquisition de marqueurs par la transduction spécialisée dépend de l'intégration de l'ADN du phage transducteur dans le chromosome de la souche réceptrice, au niveau du site spécifique d'intégration du prophage. Cette intégration qui nécessite parfois la participation d'un phage auxiliaire est effectuée par un système enzymatique spécifique du phage, qui est indépendant du système de recombinaison généralisée. Par conséquent, une souche réceptrice *rec*$^-$ peut acquérir des marqueurs génétiques par la transduction spécialisée.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Chez *E. coli*, quatre souches Hfr transfèrent une série de marqueurs génétiques dans l'ordre donné ci-dessous :

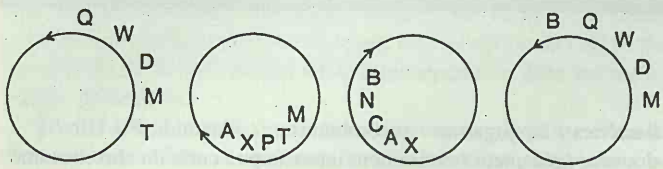
souche 1 :	Q	W	D	M	T
souche 2 :	A	X	P	T	M
souche 3 :	B	N	C	A	X
souche 4 :	B	Q	W	D	M

Toutes ces souches Hfr sont dérivées de la même souche F^+. Quel est l'ordre des marqueurs sur le chromosome circulaire de la F^+ originale ?

Solution

Rappelez-vous la bonne vieille méthode qui consiste à aborder le problème en deux étapes : (1) établir le principe sous-jacent et (2) dessiner un diagramme. Le principe ici est évidemment que chaque souche Hfr transmet ses marqueurs génétiques à partir d'une origine déterminée sur le chromosome circulaire et que les marqueurs les plus proches de l'origine sont transmis avec la fréquence la plus élevée. Puisqu'aucun des Hfr ne transmet tous les marqueurs considérés, il apparaît que seuls les marqueurs proches de l'origine sont transmis. Nous pouvons alors dessiner les cercles suivants :

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Souche 1 Souche 2 Souche 3 Souche 4

Sur base de cette information, nous pouvons réunir les différents cercles en une seule carte de liaison circulaire et l'ordre relatif des marqueurs est : Q W D M T P X A C N B Q.

2. Dans un croisement Hfr × F⁻, *leu*⁺ est le premier marqueur à entrer, mais l'ordre des autres marqueurs est inconnu. Si le Hfr est sauvage et la F⁻ auxotrophe pour tous les marqueurs considérés, quel est l'ordre des marqueurs dans un croisement où parmi les recombinants *leu*⁺ sélectionnés, 27 pour cent sont *ile*⁺, 13 pour cent *mal*⁺, 82 pour cent *thr*⁺ et 1 pour cent *trp*⁺ ?

Solution

Rappelez-vous que la rupture spontanée des paires conjugantes crée un gradient naturel de transfert qui fait qu'il est d'autant moins probable qu'un marqueur soit transféré qu'il est plus éloigné de l'origine. Comme nous avons sélectionné des recombinants correspondant au marqueur qui entre en premier dans le croisement considéré, la fréquence des autres classes de recombinants est fonction de l'ordre d'entrée des marqueurs correspondants. Par conséquent, nous pouvons déduire immédiatement l'ordre des autres marqueurs en comparant les pourcentages de recombinants obtenus pour chacun d'entre eux, parmi les recombinants *leu*⁺ sélectionnés. L'ordre est *leu - thr - ile - mal - trp*.

3. On croise un Hfr *met*⁺*thi*⁺*pur*⁺ avec une F⁻*met*⁻ *thi*⁻ *pur*⁻. Des expériences de croisement interrompu montrent que *met*⁺ est le dernier des trois marqueurs à pénétrer dans la réceptrice, de sorte que les recombinants *met*⁺ de la F⁻ sont sélectionnés sur un milieu contenant des suppléments satisfaisant uniquement les exigences *pur* et *thi*. Ces recombinants sont alors criblés pour la présence des allèles *thi*⁺ et *pur*⁺. Pour chaque génotype, on trouve le nombre d'individus que voici :

1.	*met*⁺ *thi*⁺ *pur*⁺	280
2.	*met*⁺ *thi*⁺ *pur*⁻	0
3.	*met*⁺ *thi*⁻ *pur*⁺	6
4.	*met*⁺ *thi*⁻ *pur*⁻	52

a. Pourquoi n'y avait-il pas de méthionine (met) dans le milieu de sélection ?

b. Quel est l'ordre des gènes ?

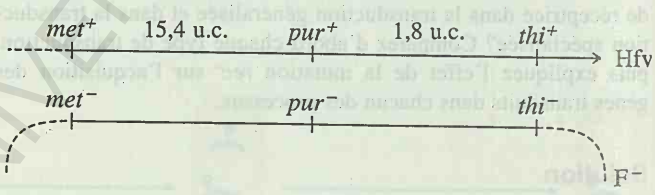
c. Quelles sont les distances cartographiques en unités de recombinaison ?

Solution

a. La méthionine fut omise du milieu pour permettre la sélection de recombinants *met*⁺. Cette sélection se justifie parce que *met*⁺ est le dernier marqueur à pénétrer dans la souche réceptrice et que nous sommes ainsi certains que les marqueurs correspondant aux loci que nous voulons cartographier seront bien présents dans celle-ci pour participer à la recombinaison.

b. Représentons les ordres dans lesquels ces gènes peuvent être disposés. Comme nous savons que *met* est le dernier à pénétrer dans la souche réceptrice, il n'y a que deux possibilités, en supposant que la premier marqueur entré se trouve à droite : *met - thi - pur* ou *met - pur - thi*. Comment distinguer d'entre ces deux ordres possibles? Dans chacun des cas, une des quatre classes de recombinants susceptibles d'être obtenues requiert deux crossing-over supplémentaires et devrait être comparativement peu représentée. Selon l'ordre des gènes, cette classe à quatre crossing-over au lieu de deux ne sera pas la même. Si l'ordre était *met - thi - pur*, les recombinants *met*⁺ *thi*⁻ *pur*⁺ devraient être très rares. Si par contre, l'ordre était *met - pur - thi*, la classe à quatre crossing-over serait *met*⁺ *pur*⁻ *thi*⁺. L'information dont nous disposons montre clairement que c'est la classe *met*⁺*pur*⁻*thi*⁺ qui est la classe à quatre crossing-over et donc que l'ordre des gènes est *met - pur -thi*.

c. Raisonnons en nous aidant du schéma que voici :



Pour calculer la distance entre *met* et *pur*, nous déterminons le pourcentage de *met*⁺ *pur*⁻ *thi*⁻ parmi les *met*⁺, ce qui nous donne 52/338 = 15,4 u.c. De même, la distance entre *pur* et *thi* est de 6/338 = 1,8 u.c.

4. Comparez les mécanismes de transfert et d'hérédité des gènes *lac*⁺ dans des croisements avec des souches Hfr, F⁺ et F'*lac*⁺. Comment une souche F⁻ chez laquelle la recombinaison homologue normale serait impossible (*rec*⁻) se comporterait-elle dans des croisements avec chacune de ces trois souches ? Cette souche hériterait-elle des gènes *lac*⁺ ?

Solution

Chacune de ces trois souches transfère des gènes par conjugaison. Dans le cas des souches Hfr et F⁺, ce seront les gènes *lac*⁺ chromosomiques qui seront transférés. Chez la souche Hfr, le facteur F est intégré dans le chromosome de chaque cellule, ce qui rend possible le transfert efficace de marqueurs chromosomiques, particulièrement de ceux localisés près du site d'intégration de F et qui sont transmis en début de croisement. La population F⁺ contient un faible pourcentage de cellules chez lesquelles F est intégré dans le chromosome. De toute la culture F⁺, seules ces cellules seront capables de transférer des gènes chromosomiques. Quand les gènes sont transmis par des Hfr ou des F⁺, leur acquisition héréditaire requiert que le fragment de chromosome qui les porte soit incorporé par recombinaison (deux crossing-over sont requis) dans le chromosome de la F⁻. Par conséquent, une F⁻ qui ne peut effectuer la recombinaison ne peut hériter de gènes chromosomiques d'un donneur, même si ces gènes sont transférés. Les fragments transférés ne peuvent être incorporés par recombinaison ; comme ils n'ont pas la faculté de se répliquer dans la cellule

F^-, ils sont rapidement perdus par dilution au cours des divisions cellulaires successives.

Contrairement à ce qui se passe dans le cas des Hfr et F^+, le transfert de gènes portés par le facteur F' ne requiert pas de transfert chromosomique. Dans notre exemple, les gènes *lac*$^+$ sont liés au F' et seront transférés avec lui avec une grande efficacité. Dans la F^-, la recombinaison n'est pas nécessaire, puisque l'épisome F'*lac*$^+$ peut se répliquer et se maintenir de façon stable dans la population de F^- en cours de division. Par conséquent, les gènes *lac*$^+$ seront hérités même par une souche *rec*$^-$.

PROBLÈMES

1. Décrivez la situation du facteur F dans une souche Hfr, F^+ et F^-.

2. De quelle façon une culture de cellules F^+ peut-elle transférer des marqueurs chromosomiques dans une souche réceptrice?

3. Comparez le transfert de gènes et l'intégration des gènes transférés dans le chromosome de la cellule réceptrice

a. dans le cas de croisements impliquant une souche Hfr et dans la transduction généralisée

b. lors du transfert de facteurs F' tels que F'lac et lors de la transduction spécialisée.

4. Pourquoi la transduction généralisée peut-elle transférer pratiquement tous les gènes alors que la transduction spécialisée se limite à un groupe de gènes déterminés?

5. Une spécialiste en génétique microbienne isole une nouvelle mutation chez *E. coli* et désire la localiser sur la carte chromosomique. Elle utilise à cette fin des expériences de croisement interrompu avec différentes souches Hfr et des expériences de transduction généralisée avec le phage P1. Expliquez pourquoi chacune de ces techniques utilisée isolément ne permet habituellement pas une localisation précise.

6. Chez *E.coli*, quatre souches Hfr transfèrent une série de marqueurs dans l'ordre donné ci-dessous :

souche 1 :	M	Z	X	W	C
souche 2 :	L	A	N	C	W
souche 3 :	A	L	B	R	U
souche 4 :	Z	M	U	R	B

Chacune de ces souches Hfr dérive d'une même souche F^+. Quel est l'ordre de ces marqueurs sur le chromosome de la F^+ originale ?

7. Quatre souches d'*E. coli* de génotype a^+b^- sont désignées 1, 2, 3 et 4. Quatre souches de génotype a^-b^+ sont désignées 5, 6, 7 et 8. Toutes les combinaisons possibles de souches des deux génotypes sont réalisées, puis, après incubation, étalées pour déterminer la fréquence des recombinants a^+b^+. Les résultats obtenus sont repris dans le tableau suivant, où B = beaucoup de recombinants, P = peu de recombinants et O = pas de recombinants.

	1	2	3	4
5	O	B	B	O
6	O	B	B	O
7	P	O	O	B
8	O	P	P	O

Sur la base de ces résultats, attribuez un type conjugant (Hfr, F^+ ou F^-) à chaque souche.

8. Une souche Hfr de génotype $a^+ b^+ c^+ d^- str^s$ est croisée avec une souche F^- de génotype $a^- b^- c^- d^+ str^r$. A intervalles réguliers, un échantillon de la culture est agité vigoureusement pour séparer les paires en cours de croisement. Les cellules sont alors étalées sur trois milieux solides de composition différente, dans lesquels le nutriment A permet la croissance des cellules a^- ; le nutriment B, la croissance des cellules b^- ; C, celle des c^- et D, celle des d^- (un signe + indique la présence du supplément nutritif, un signe -, son absence) :

Type d'agar	str	A	B	C	D
1	+	+	+	-	+
2	+	-	+	+	+
3	+	+	-	+	+

a. Quels gènes du donneur sélectionne-t-on sur chaque type d'agar ?

b. Le tableau 10-5 donne le nombre de colonies apparues sur chaque type d'agar au départ d'échantillons prélevés aux temps indiqués après que les souches aient été mises en présence. Servez-vous de cette information pour déterminer l'ordre des gènes *a*, *b* et *c*.

c. 100 colonies apparues sur chacune des boîtes contenant les échantillons «25 minutes» sont transplantées sur une boîte d'un milieu contenant tous les suppléments sauf D. Le nombre de colonies croissant sur ce milieu est de 89 pour l'échantillon venant de l'agar de type 1, 51 pour l'échantillon de l'agar de type 2 et 8 pour

Tableau 10-5.

Temps de prélèvement (minutes)	Nombre de colonies sur l'agar de type		
	1	2	3
0	0	0	0
5	0	0	0
7,5	100	0	0
10	200	0	0
12,5	300	0	75
15	400	0	150
17,5	400	50	225
20	400	100	250
25	400	100	250

BCU LAUSANNE / CENTRE UNIVERSITAIRE LIBRARY

l'échantillon venant de l'agar de type 3. D'après ce résultat, situez le gène *d* dans la séquence des gènes *a, b* et *c*.

d. A partir de quel échantillon vous attendriez-vous à voir apparaître des colonies sur de l'agar contenant C et de la streptomycine, mais ni A ni B ?

(Le problème 8 est extrait de D. Freifelder, *Molecular Biology and Biochemistry* Copyright © 1978 par W.H. Freeman and Company.)

9. On vous donne deux souches d'*E. coli*. La souche Hfr est $arg^+ ala^+ glu^+ pro^+ leu^+ T^s$; la F^- est $arg^- ala^- glu^- pro^- leu^- T^r$. Tous les marqueurs sont de type nutritionnel, sauf *T,* qui représente la sensibilité ou la résistance au phage T1. L'ordre de transfert est donné : arg^+ pénètre le premier dans la réceptrice et T^s le dernier. Vous découvrez que la souche F^- meurt quand elle est exposée à la pénicilline (pen^s), mais pas la souche Hfr (pen^r). Comment localiseriez-vous le locus *pen* par rapport à *arg, ala, glu, pro* et *leu* ? Exposez votre réponse logiquement en expliquant bien chaque étape et illustrez-la par des schémas.

10. On croise un Hfr $arg^+ bio^+ leu^+$ avec une F^- $arg^- bio^- leu^-$. Une expérience de croisement interrompu montre qu'arg^+ est le dernier marqueur transféré dans la F^-. Les recombinants arg^+, sélectionnés sur un milieu contenant de la biotine (*bio*) et de la leucine (*leu*), sont analysés pour la présence des allèles bio^+ et leu^+. Pour chaque classe génotypique, on trouve le nombre d'individus que voici :

$arg^+ bio^+ leu^+$	320
$arg^+ bio^+ leu^-$	8
$arg^+ bio^- leu^+$	0
$arg^+ bio^- leu^-$	48

a. Quel est l'ordre des gènes ?

b. Quelles sont les distances en unités cartographiques ?

11. Vous effectuez le croisement suivant entre souches d'*E. coli* : Hfr $Z_1^- ade^+ str^s \times F^- Z_2^- ade^- str^r$, dans lequel *str* détermine la résistance ou la sensibilité à la streptomycine, *ade* détermine l'auxotrophie pour l'adénine et Z_1 et Z_2 sont les sites très proches où des allèles Z^- empêchent l'utilisation du lactose comme source d'énergie. Après une heure, les cellules sont étalées sur un milieu contenant du glucose comme source d'énergie et de la streptomycine. Parmi les colonies ade^+ qui se développent sur les boîtes, nombreuses sont celles qui s'avèrent capables de métaboliser le lactose (lac^+). Par contre, très peu des colonies ade^+ issues du croisement réciproque Hfr $Z_2^- ade^+ str^s \times F^- Z_1^- ade^+ str^r$ sont capables d'utiliser le lactose. Quel est l'ordre des sites Z_1 et Z_2 par rapport au locus *ade* ? (Le locus *str* est transféré en fin de croisement, après les loci analysés.)

12. François Jacob isola huit mutations lac^- étroitement liées (désignées *lac*-1 à *lac*-8), puis entreprit de les cartographier par rapport aux marqueurs flanquants *pro* (proline) et *ade* (adénine) en effectuant une paire de croisements réciproques pour chaque paire de mutants *lac* :

Tableau 10-7.

x	y	Croisement A	Croisement B	x	y	Croisement A	Croisement B
1	2	173	27	1	8	226	40
1	3	156	34	2	3	24	187
1	4	46	218	2	8	153	17
1	5	30	197	3	6	20	175
1	6	168	32	4	5	205	17
1	7	37	215	5	7	199	34

Croisement A Hfr $pro^- lac\text{-}x\ ade^+ \times F^-\ pro^+ lac\text{-}y\ ade^-$

Croisement B Hfr $pro^- lac\text{-}y\ ade^+ \times F^-\ pro^+ lac\text{-}x\ ade^-$

Dans chacun des cas, des prototrophes furent sélectionnés par étalement sur minimum contenant du lactose comme seule source de carbone. Le tableau 10-6 donne le nombre de colonies obtenues dans les deux croisements faits avec chaque paire de mutants. Déterminez l'ordre des mutations.

(Le problème 12 est extrait de Burton S. Guttman, *Biological Principles* Copyright © 1971, W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Californie.)

13. La carte de liaison d'une souche bactérienne Hfr est établie en minutes (le nombre de minutes entre deux gènes représente l'intervalle de temps écoulé entre leurs transferts respectifs par conjugaison). En établissant de telles cartes, les généticiens font implicitement l'hypothèse que le chromosome bactérien est transféré du Hfr dans la F^- à vitesse constante. Deux gènes séparés par 10 minutes près de l'origine de transfert sont considérés comme étant à la même distance *physique* l'un de l'autre que deux gènes séparés par 10 minutes près du site d'intégration de F. Suggérez une expérience permettant de tester de façon critique la validité de cette hypothèse.

14. Dans le croisement Hfr $aro^+ arg^+ ery^r str^s \times F^- aro^- arg^- ery^s str^r$, les marqueurs sont transférés dans l'ordre indiqué (aro^+ entrant le premier), mais les trois premiers gènes sont très proches l'un de l'autre. Les exconjugants sont étalés sur un milieu contenant str (de la streptomycine, pour contre-sélectionner les cellules Hfr), ery (erythromycine), arg (arginine) et aro (des acides aminés aromatiques). L'analyse de 300 colonies apparues sur ce milieu donne les résultats suivants : 263 souches croissent sur ery, 264 croisent sur ery + arg, 290 sur ery + aro et 300 sur ery + arg + aro.

a. Etablissez une liste des différents génotypes et indiquez le nombre d'individus correspondants.

b. Calculez les fréquences de recombinaison.

c. Calculez le rapport des intervalles *arg - aro* et *ery - arg*.

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

15. Une souche Hfr transmet normalement le marqueur *pro*$^+$ en fin de conjugaison. Dans un croisement de ce Hfr avec une souche F$^-$, de rares recombinants *pro*$^+$ sont obtenus en début de croisement. Quand ces cellules *pro*$^+$ sont mélangées à des F$^-$, la majorité des F$^-$ sont converties en cellules *pro*$^+$ qui contiennent le facteur F. Expliquez ces résultats.

16. Les souches F' d'*E. coli* dérivent des Hfr. Chez certaines d'entre elles, le F' est réinséré dans le chromosome avec une fréquence élevée. De plus, le site d'intégration est souvent celui que le facteur sexuel occupait déjà dans le Hfr original. Expliquez ces résultats.

17. Vous disposez de deux souches d'*E. coli*, F$^-$ *str*^{r} *ala*$^-$ et Hfr *str*^{s} *ala*$^+$ chez laquelle F est intégré près de *ala*$^+$. Proposez une méthode de criblage permettant de détecter des sexductants F' *ala*$^+$.

18. Cinq souches Hfr, A - E, sont obtenues au départ d'une même souche F$^+$. Le tableau ci-dessous reprend les temps d'entrée des cinq premiers marqueurs transférés dans une souche F$^-$ par chacune d'elles lors d'une expérience de croisement interrompu.

A	B	C	D	E
mal$^+$ (1)	*ade*$^+$ (13)	*pro*$^+$ (3)	*pro*$^+$ (10)	*his*$^+$ (7)
str^s (11)	*his*$^+$ (28)	*met*$^+$ (29)	*gal*$^+$ (16)	*gal*$^+$ (17)
ser$^+$ (16)	*gal*$^+$ (38)	*xyl*$^+$ (32)	*his*$^+$ (26)	*pro*$^+$ (23)
ade$^+$ (36)	*pro*$^+$ (44)	*mal*$^+$ (37)	*ade*$^+$ (41)	*met*$^+$ (49)
his$^+$ (51)	*met*$^+$ (70)	*str*^{s} (47)	*ser*$^+$ (61)	*xyl*$^+$ (52)

a. Dessinez une carte de la souche F$^+$ en indiquant la position de tous les gènes et les distances en minutes qui les séparent.

b. Indiquez le point d'insertion et l'orientation de F dans chaque souche Hfr.

c. Pour chacun des Hfr, quel gène sélectionneriez-vous pour obtenir un maximum de Hfr parmi les exconjugants?

19. Des cellules de *Streptococcus pneumoniae* de génotype *str*^{s} *mtl*$^-$ sont transformées par l'ADN d'un donneur de génotype *str*^{r} *mtl*$^+$ et (dans une autre expérience) par un mélange de deux ADN de génotypes *str*^{r} *mtl*$^-$ et *str*^{r} *mtl*$^+$. Les résultats sont donnés dans le tableau 10-7.

a. Que vous apprend la première ligne du tableau ? Pourquoi ?

Tableau 10-7.

ADN transformant	Pourcentage de cellules transformées vers		
	str^r *mtl*$^+$	*str*^{s} *mtl*$^+$	*str*^{r} *mtl*$^+$
str^r *mtl*$^+$	4,3	0,40	0,17
str^r *mtl*$^+$ + *str*^{s}*mtl*$^+$	2,8	0,85	0,0066

Tableau 10-8.

Antibiotique(s) présent(s)	Nombre de colonies	Antibiotique(s) présent(s)	Nombre de colonies
Aucun	10.000	BC	51
A	1.156	BD	49
B	1.148	CD	786
C	1.161	ABC	30
D	1.139	ABD	42
AB	46	ACD	630
AC	640	BCD	36
AD	942	ABCD	30

b. Que vous apprend la seconde ligne ? Pourquoi ?

20. Dans une expérience de transformation, le donneur est résistant à quatre antibiotiques : A, B, C et D. La réceptrice est sensible à ces quatre antibiotiques. La population de cellules transformées est divisée et étalée sur des milieux contenant différentes combinaisons d'antibiotiques. Les résultats sont présentés dans le tableau 10-8.

a. Un des gènes est manifestement très éloigné des trois autres, qui semblent étroitement liés. Quel est le gène éloigné ?

b. Quel est l'ordre probable des trois gènes liés ?

(Le problème 20 est extrait de Franklin Stahl, *The Mechanics of Inheritance*, 2d ed. Copyright © 1969, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. Reproduit avec autorisation.)

21. Dans le chapitre 5, nous avons discuté de la probabilité qu'un crossing-over puisse influencer la production d'un autre crossing-over dans la même région. Chez le bactériophage T4, le gène *a* est à 1 u.c. du gène *b*, qui est lui-même à 0,2 u.c. du gène *c*. L'ordre des gènes est *a* - *b* - *c*. Dans une expérience de recombinaison, vous obtenez cinq cas de doubles crossing-over entre *a* et *c* sur une descendance de 100.000 virus. Est-il exact de conclure qu'il y a interférence négative ? Expliquez votre réponse.

22. Vous infectez des cellules d'*E. coli* avec deux souches de bactériophage T4. Une des souches lyse rapidement (*r*), produit des plages de petite dimension («minute», *m*) et troubles (*tu*) ; l'autre est sauvage pour tous ces marqueurs. Les bactéries infectées sont étalées et les plages produites rangées en catégories. Sur 10.342 plages analysées, voici les effectifs recensés pour les différents génotypes :

m r tu	3467	*m* + +	520
+ + +	3729	+ *r tu*	474
m r +	853	+ *r* +	172
m + *tu*	162	+ + *tu*	965

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a. Déterminez les distances entre *m* et *r*, entre *r* et *tu* et entre *m* et *tu*.

b. Dans quel ordre rangeriez-vous les trois gènes ?

c. Quel est le coefficient de coïncidence dans ce croisement et que signifie-t-il ?

(Le problème 22 est extrait de Monroe W. Strickberger, *Genetics*, Copyright © 1968 Monroe W. Strickberger, et reproduit avec l'autorisation de Macmillan Publishing Co., Inc.)

23. Un phage P22 cultivé dans une souche bactérienne donneuse $pur^+ pro^+ his^+$ est utilisé en transduction généralisée pour infecter une souche réceptrice de génotype $pur^- pro^- his^-$. Les transductants pour chacun des gènes donneurs font l'objet de sélections indépendantes désignées respectivement I, II et III.

a. Quelle est la composition des différents milieux sélectifs ?

b. Les transductants sont testés pour la présence des marqueurs du donneur non sélectionnés, avec les résultats suivants :

I	II	III
$pro^- his^-$ 87 %	$pur^- his^-$ 43 %	$pur^- pro^-$ 21 %
$pro^+ his^-$ 0 %	$pur^+ his^-$ 0 %	$pur^+ pro^-$ 15 %
$pro^- his^+$ 10 %	$pur^- his^+$ 55 %	$pur^- pro^+$ 60 %
$pro^+ his^+$ 3 %	$pur^+ his^+$ 2 %	$pur^+ pro^+$ 4 %

Quel est l'ordre des gènes ?

c. Quels sont les deux gènes les plus proches l'un de l'autre ?

d. Sur la base de l'ordre proposé en (c), expliquez les rapports de génotypes observés dans la sélection II.

(Le problème 23 est reproduit avec l'aimable autorisation de D. Freifelder, extrait de *Molecular Biology and Biochemistry*, Copyright © 1978 par W.H. Freeman and Company.)

24. Bien que la plupart des transductants gal^+ obtenus par transduction spécialisée avec le phage λ soient des lysogènes inductibles, un faible pourcentage d'entre eux ne le sont pas (ne contiennent pas de λ intégré). Des expériences de contrôle montrent que ces transductants ne sont pas produits par mutation. Quelle est l'origine probable de cette classe ?

25. On sait qu'une souche bactérienne $ade^+ arg^+ cys^+ his^+ leu^+ pro^+$ est lysogène pour un phage nouvellement découvert, mais le site du prophage n'est pas connu. Voici la carte génétique de la bactérie :

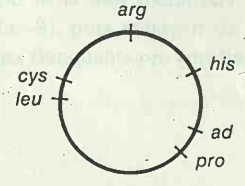


Tableau 10-9.

Milieu	Supplément au milieu minimum ade	arg	cys	his	leu	pro	Présence de colonies
1	-	+	+	+	+	+	N
2	+	-	+	+	+	+	N
3	+	+	-	+	+	+	C
4	+	+	+	-	+	+	N
5	+	+	+	+	-	+	C
6	+	+	+	+	+	-	N

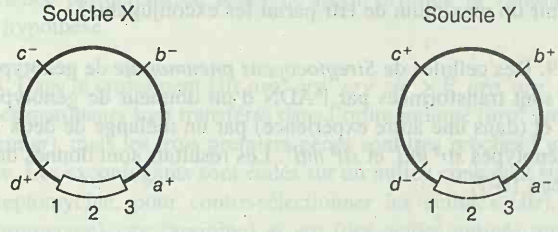
NOTE : + indique la présence d'un supplément nutritionnel ; - son absence. N signifie pas de colonies ; C leur présence.

On produit du phage au départ de la souche lysogène et on infecte une souche de génotype $ade^- arg^- cys^- his^- leu^- pro^-$. Après une courte incubation, des aliquotes de bactéries infectées sont étalées sur différents milieux contenant les suppléments nutritionnels décrits dans le tableau 10-9. Le tableau indique également si des colonies sont ou non observées sur les différents milieux.

a. Quel est le phénomène génétique mis en jeu dans cette expérience ?

b. Quelle est la localisation approximative du prophage ?

26. Deux souches de λ peuvent lysogéniser *E. coli*. La figure ci-dessous décrit leurs cartes génétiques :



Le segment désigné 1 - 2 - 3 est la région responsable de l'appariement et de la recombinaison avec le chromosome d'*E.coli*.. (Reprenez ces marqueurs dans tous vos diagrammes.)

a. Faites un schéma de la façon dont le phage X est inséré dans le chromosome d'*E. coli*.

b. Les bactéries lysogènes pour X peuvent être surinfectées par la souche de phage Y. Un certain nombre de ces bactéries surinfectées deviennent doublement lysogènes (c'est-à-dire lysogènes pour les deux souches X et Y). Représentez le mécanisme de cette double lysogénisation. (Ne vous préoccupez pas de savoir comment on identifie les doubles lysogènes.)

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

c. Dessinez l'appariement des deux prophages λ.

d. Il est possible d'isoler les produits de crossing-over entre les deux prophages. Faites un croquis d'un tel crossing-over et de ses conséquences.

27. Vous disposez de trois souches d'*E. coli*. La souche A est F'*cys*$^+$ *trp1* / *cys*$^+$ *trp1* (le F' et le chromosome portent chacun *cys*$^+$ et *trp1*, un allèle responsable d'une auxotrophie pour le tryptophane). La souche B est F$^-$*cys*$^-$ *trp2* Z (cette souche exige de la cystéine et contient *trp2*, un autre allèle entraînant l'auxotrophie pour le tryptophane ; la souche B est également lysogène pour le phage transducteur généralisé Z). La souche C est F$^-$*cys*$^+$ *trp1* (c'est un dérivé F$^-$ de la souche A qui a perdu le F').

a. Comment détermineriez-vous si *trp1* et *trp2* sont allèles ? (Décrivez les croisements et les résultats attendus.)

b. Supposons que *trp1* et *trp2* soient allèles et que *cys* soit cotransduit avec *trp*. En utilisant le phage Z pour transduire ces gènes de la souche C dans la souche B, comment détermineriez-vous l'ordre de *cys*, *trp1* et *trp2* ?

28. Une souche d'*E. coli* $a^- b^- c^- d^- e^-$ est transduite par un phage transducteur généralisé qui a crû sur une souche donneuse $a^+ b^+ c^+ d^+ e^+$. Des cellules de la réceptrice transduite sont étalées sur différents milieux. Les résultats sont présentés dans le tableau 10-10. (a^- est responsable d'une exigence pour le nutriment A et ainsi de suite). Que pouvez-vous en déduire quant à la liaison et à l'ordre des gènes ?

Tableau 10-10.

Substances ajoutées au milieu minimum	Présence (+) ou absence (-) de colonies
C D E	-
B D E	-
B C E	+
B C D	+
A D E	-
A C E	-
A C D	-
A B E	-
A B D	+
A B C	-

REMARQUE : L'allèle a^- détermine une exigence nutritionnelle pour la substance A, et ainsi de suite.

29. Dans une expérience de transduction généralisée avec le phage P1, le donneur est *pur*$^+$ *nad*$^+$ *pdx*$^-$ et le récepteur est *pur*$^-$ *nad*$^-$ *pdx*$^+$. Après la transduction, on sélectionne l'allèle *pur*$^+$ du donneur et 50 des transductants *pur*$^+$sont analysés pour voir lesquels des autres allèles sont présents. Voici les résultats :

Génotype	Nombre de colonies
nad$^+$ *pdx*$^+$	3
nad$^+$ *pdx*$^-$	10
nad$^-$ *pdx*$^+$	24
nad$^-$ *pdx*$^-$	13
	50

a. Quelle est la fréquence de cotransduction de *pur* et *nad* ?

b. Quelle est la fréquence de cotransduction de *pur* et *pdx* ?

c. Lequel des loci des marqueurs non sélectionnés est-il le plus proche de *pur* ?

d. *nad* et *pdx* se trouvent-ils du même côté de *pur* ou de part et d'autre ? Expliquez. (Dessinez les échanges qui produiraient les différentes classes de transductants dans chaque topographie, de façon à déterminer celle où les résultats sont obtenus avec le moins d'échanges.)

30. Des phages transducteurs généralisés provenant d'un *E. coli* donneur de génotype *cys*$^+$ *leu*$^+$ *thr*$^+$ sont utilisés pour transduire un récepteur *cys*$^-$ *leu*$^-$ *thr*$^-$. La population transduite est étalée sur un milieu minimum additionné de leucine et de thréonine. De nombreuses colonies sont obtenues.

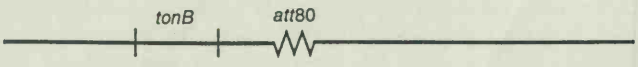
a. Quels génotypes ces colonies peuvent-elles avoir ?

b. Ces colonies sont répliquées sur trois milieux différents : (1) minimum plus thréonine, (2) minimum plus leucine, et (3) minimum. Quels sont les génotypes qui permettraient la croissance sur ces différents milieux ?

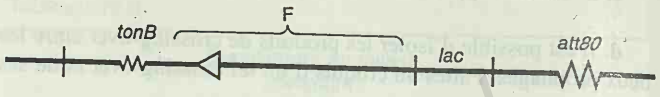
c. On observe que 56 % des colonies sélectionnées croissent sur (1), 5 % sur (2), et qu'aucune colonie ne croît sur (3). Quels sont les génotypes des colonies croissant (ou non) sur ces différents milieux ?

d. Dessinez une carte montrant l'ordre relatif des trois gènes ainsi que celui des deux gènes flanquants qui se trouve le plus près du gène situé au centre.

*31. En 1965, Jon Beckwith et Ethan Signer élaborèrent une méthode permettant d'obtenir des phages transducteurs spécialisés porteurs de la région *lac*. Ils suivirent une stratégie en deux temps, «transposant» d'abord les gènes *lac* dans une autre région du chromosome, isolant ensuite les particules transductrices. Ils observèrent que le site d'intégration du phage tempéré ϕ80 (un parent du phage λ), désigné *att80*, se trouvait à proximité d'un des gènes impliqués dans la résistance au phage virulent T1, et désigné *tonB* :



Beckwith et Signer se servirent d'un épisome F'*lac* qui ne pouvait se répliquer à température élevée, dans une souche contenant une délétion des gènes *lac*. En forçant les cellules à demeurer *lac*$^+$ à haute température, ces deux chercheurs sélectionnèrent des souches chez lesquelles l'épisome s'était intégré dans le chromosome, permettant ainsi à F'*lac* de se maintenir (d'être répliqué) à température élevée. En combinant cette sélection avec celle de la résistance au phage T1, ils arrivèrent à ce que les seules cellules survivantes soient celles chez lesquelles le F'*lac* s'était intégré dans le locus *tonB*, comme le montre la figure ci-dessous. Voyez-vous pourquoi ?



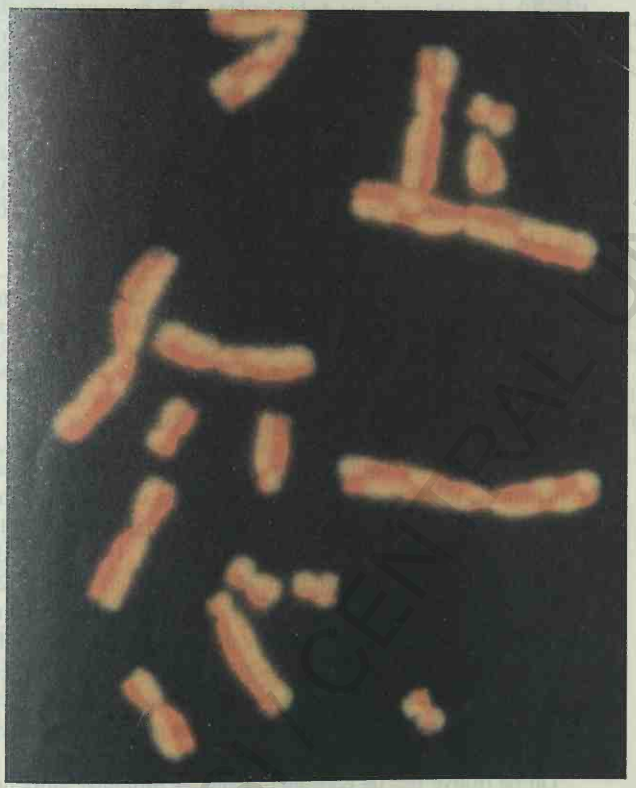
Cette sélection positionnait la région *lac* près du site d'intégration du phage ϕ80. Décrivez les étapes ultérieures requises à l'isolement de particules ϕ80 transductrices spécialisées portant la région *lac*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

11

La structure de l'ADN



Chromosomes arlequin. (Sheldon Wolff / Université de Californie, San Fransisco)

CONCEPTS-CLÉS

- Les cellules bactériennes qui manifestent un phénotype déterminé peuvent être transformées en cellules présentant un phénotype différent ; l'agent transformant est l'ADN.
- Des expériences utilisant un phage T2 marqué ont identifié l'ADN comme le matériel héréditaire.
- James Watson et Francis Crick ont montré que l'ADN possède une structure en double hélice dont chaque hélice est une chaîne de nucléotides unis par des liaisons phosphodiester, les deux chaînes étant liées entre elles par des liaisons hydrogène spécifiques entre paires de bases.
- La structure de l'ADN explique la fidélité de sa réplication puisque chaque base détermine la base qui lui est complémentaire grâce aux contraintes imposées par la formation des liaisons hydrogène qui les unissent.
- La réplication de l'ADN est semi-conservative de sorte que chaque double hélice fille possède un brin parental et un brin néo-synthétisé.
- La plupart des enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN bactérien ont été caractérisées.

BCU IAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Jusqu'à présent, nous avons considéré les gènes comme des entités abstraites qui, d'une manière ou d'une autre, déterminent les caractères héréditaires. Par une analyse purement génétique, nous avons suivi la transmission d'un certain nombre de gènes. Mais qu'en est-il de la nature physique de ces gènes ? Cette question a embarrassé les hommes de sciences pendant de nombreuses années, jusqu'à ce qu'on réalise que les gènes sont constitués d'acide désoxyribonucléique (abréviation *ADN*) et que cet ADN possède une structure remarquable.

L'élucidation de la structure de l'ADN par James Watson et Francis Crick, en 1953, fut une des découvertes les plus sensationnelles de l'histoire de la génétique. Elle a ouvert la voie à la compréhension en termes moléculaires de l'action des gènes et de l'hérédité. Avant de voir comment la structure de l'ADN fut établie, voyons ce qu'on savait des gènes et de l'ADN au moment où Watson et Crick entamèrent leur collaboration historique :

1. Les gènes — les «facteurs héréditaires» décrits par Mendel — étaient connus pour être associés à des caractères héréditaires spécifiques, mais leur nature physique restait inconnue.

2. La relation un gène–une enzyme (décrite plus en détail au chapitre 12) postulait que les gènes déterminent la structure des protéines.

3. On savait que les gènes sont portés par les chromosomes.

4. On avait montré que les chromosomes sont constitués d'ADN et de protéines.

5. Les recherches de Frederick Griffith et, plus tard, celles d'Oswald Avery et de ses collaborateurs, désignaient l'ADN comme le matériel héréditaire. Ces expériences, décrites ci-après, montraient que des cellules bactériennes présentant un phénotype déterminé pouvaient être converties en cellules exprimant un phénotype différent et que l'agent transformant était l'ADN.

L'ADN, matériel génétique

La découverte de la transformation

En 1928, Frederick Griffith fit une observation inattendue au cours d'expériences qui avaient pour objet la bactérie *Streptococcus pneumoniae*. Cette bactérie, qui provoque la pneumonie chez les humains, est normalement létale pour les souris. Toutefois, il existe des souches de cette espèce qui diffèrent des bactéries sauvages par leur absence de virulence (aptitude à causer la maladie ou la mort). Dans ses expériences, Griffith a utilisé deux souches discernables par l'aspect des colonies qu'elles forment lorsqu'elles sont cultivées en laboratoire. La première est virulente et ses cellules sont entourées d'une enveloppe polysaccharidique qui donne aux colonies une apparence lisse ; elle est appelée *S* (pour «smooth»). Chez l'autre souche de Griffith, un mutant non virulent qui se développe chez la souris mais n'est pas létal, la capsule polysaccharidique est absente et les colonies ont un aspect rugueux ; cette souche est appelée *R* (pour «rough»).

Griffith tua des cellules virulentes en les chauffant à ébullition et inocula les cellules mortes à des souris. Celles-ci survécurent, montrant donc que les cellules tuées ne causent pas la mort des souris. En revanche, les souris inoculées avec un mélange de cellules virulentes tuées par la chaleur et de cellules non virulentes vivantes moururent. En outre, des cellules vivantes purent être réisolées à partir des souris mortes ; elles formaient des colonies lisses et se montraient virulentes après inoculation. D'une quelconque manière, les débris des cellules S chauffées avaient donc converti les cellules R vivantes en cellules S. Ce phénomène est appelé **transformation.** L'expérience de Griffith est résumée dans la figure 11-1.

La même technique de base fut utilisée pour déterminer la nature du «*principe transformant*» — l'agent des débris cellulaires qui est spécifiquement responsable de la transformation. En 1944, Oswald Avery, C.M. MacLeod et M. McCarthy séparèrent les différentes classes de molécules présentes dans les débris des cellules S mortes et testèrent l'aptitude de chacune d'elles à induire la transformation. Ces tests montrèrent d'abord que les polysaccharides eux-mêmes n'ont aucune activité transformante. Dès lors, la capsule polysaccharidique, tout en étant indubitablement impliquée dans le processus pathogénique, n'apparaissait que comme l'expression phénotypique de la virulence. En examinant les différentes classes de molécules, Avery et ses collègues établirent que seul l'ADN était capable d'induire la transformation des cellules R (figure 11-2). Ils en déduisirent que l'ADN est l'agent qui détermine la présence du polysaccharide et, par conséquent, le caractère pathogène (voir les pages 290-291 pour une description du mécanisme de la transformation). De plus, il devenait évident que mettre les cellules S en présence de l'ADN des cellules R équivalait à leur fournir les gènes S !

Message La démonstration que l'ADN est le principe transformant constituait la première preuve que les gènes sont composés d'ADN.

L'expérience de Hershey et Chase

Les expériences réalisées par Avery et ses collègues étaient concluantes, mais de nombreux scientifiques se refusaient encore à admettre que l'ADN, plutôt que les protéines, était le matériel génétique. L'argument décisif fut fourni en 1952 par Alfred Hershey et Martha Chase qui utilisèrent le phage (virus) T2. Ils estimèrent que l'infection par le phage devait comporter l'introduction (l'injection) dans la bactérie d'une information spécifique capable d'imposer à celle-ci la multiplication virale. Le phage est relativement simple du point de vue de sa constitution moléculaire. Sa structure est principalement de nature protéique et son ADN est enfermé dans l'enveloppe protéique de sa «tête».

On ne trouve pas de phosphore dans les protéines alors que le soufre en est un constituant important ; inversément, le soufre est présent dans les protéines mais jamais dans l'ADN. Hershey et Chase incorporèrent le radio-isotope du phosphore (^{32}P) dans l'ADN d'une culture de phage et celui du soufre (^{35}S) dans les protéines d'une autre culture de ce même phage. Ensuite, ils utilisèrent indépendamment chacune de ces cultures de phage pour infecter *E. coli* à raison d'un nombre élevé de particules virales par cellule bactérienne. Après un temps suffisant pour que l'infection ait eu lieu, ils détachèrent les enveloppes de phage vides (appelées *ghosts*, fantômes) des cellules bactériennes par agitation mécanique au moyen d'un mixeur. Par centrifugation, ils séparèrent les cellules bactériennes des ghosts et mesurèrent la radioactivité des deux fractions obtenues. En utilisant les phages marqués au ^{32}P, la majeure partie de la radioactivité aboutissait dans les cellules bac-

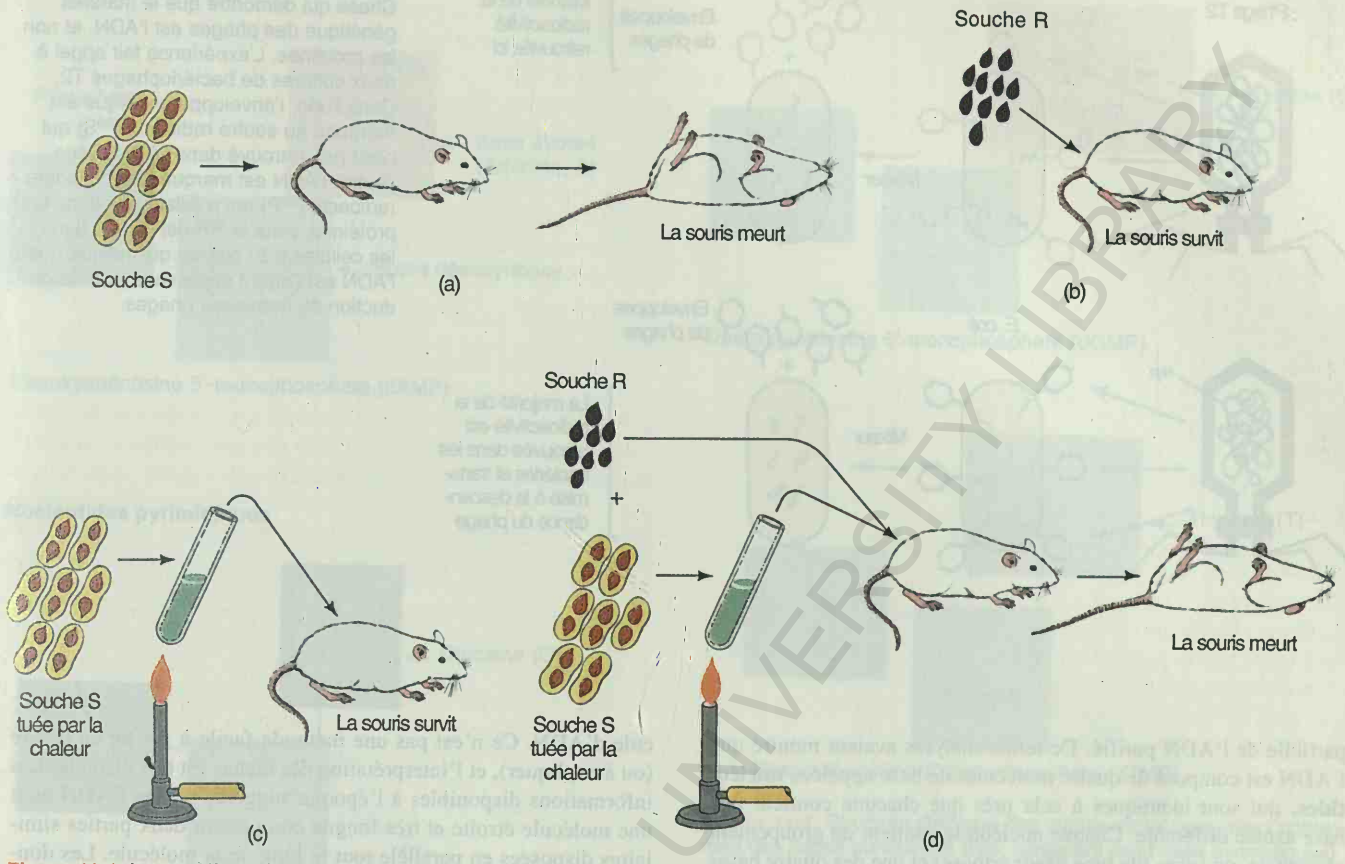


Figure 11-1. La première démonstration de la transformation bactérienne. (a) Une souris meurt après une injection de la souche virulente S. (b) Une souris survit à l'injection de la souche R. (c) Une souris survit à l'injection de la souche S tuée par chauffage. (d) Une souris meurt après l'injection d'un mélange de la souche S tuée par chauffage et de la souche R vivante. D'une manière ou d'une autre autre, la souche S tuée par chauffage peut donc conférer la virulence à la souche R. Les points (a), (b) et (c) interviennent comme témoins dans cette démonstration. (De G.S. Stent et R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2ième éd. Copyright © 1978 par W.H. Freeman and Company. D'après R. Sager et F. J. Ryan, *Cell Heredity*, John Wiley, 1961.)

BOUJASI / CENTRE UNIVERSITY LIBRARY

tériennes, indiquant que l'ADN de phage entre dans ces cellules. Une partie du ^{32}P était également retrouvée dans la descendance des phages. Au contraire, à partir de phages marqués au ^{35}S, la majorité du matériel radioactif restait dans les ghosts, montrant que les protéines du phage n'avaient jamais pénétré dans la cellule bactérienne (figure 11-3). La conclusion de ces observations est inéluctable : l'ADN est le matériel héréditaire tandis que les protéines de phages ne sont qu'un emballage qui est écarté une fois que le précieux ADN a été injecté dans la cellule bactérienne.

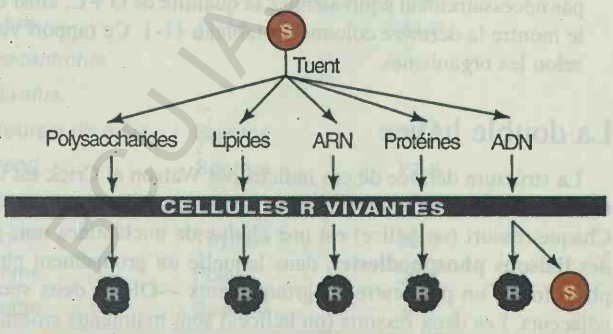


Figure 11-2. Démonstration que l'ADN est l'agent transformant. L'ADN est le seul agent qui produit des colonies lisses (S) lorsqu'il est ajouté à des cellules rugueuses (R) vivantes.

Pourquoi y eut-il tant de répugnance à accepter cette conclusion ? L'ADN apparaissait comme une substance chimique relativement simple et l'on voyait mal comment toute l'information correspondant aux propriétés d'un organisme pouvait être emmagasinée dans une molécule aussi simple. De plus, comment cette information pouvait-elle être transmise d'une génération à une autre ? Il était clair que le matériel génétique devait posséder à la fois la capacité d'encoder une information spécifique et l'aptitude à la reproduire avec précision. Quelle sorte de structure permettait à une molécule aussi simple que l'ADN d'assurer des fonctions aussi complexes ?

La structure de l'ADN

Si la structure de l'ADN n'était pas connue, la nature de ses constituants de base l'était, elle, depuis de nombreuses années. Ils avaient été isolés et identifiés après la décomposition chimique

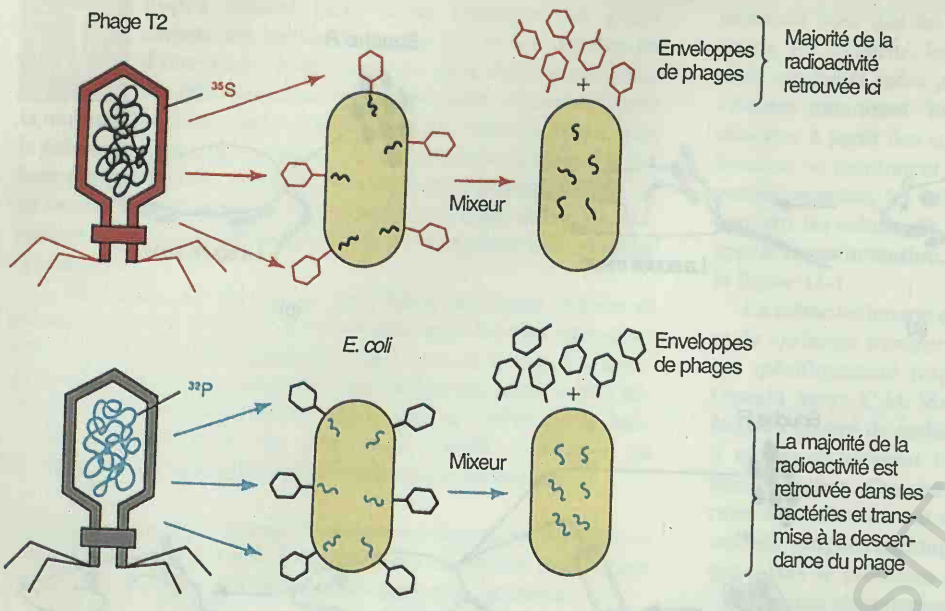


Figure 11-3. L'expérience de Hershey et Chase qui démontre que le matériel génétique des phages est l'ADN, et non les protéines. L'expérience fait appel à deux cultures de bactériophages T2. Dans l'une, l'enveloppe protéique est marquée au soufre radioactif (^{35}S) qui n'est pas retrouvé dans l'ADN. Dans l'autre, l'ADN est marqué au phosphore radioactif (^{32}P) qui n'existe pas dans les protéines. Seul le ^{32}P est injecté dans les cellules d'*E. coli*, ce qui indique que l'ADN est l'agent nécessaire pour la production de nouveaux phages.

partielle de l'ADN purifié. De telles analyses avaient montré que l'ADN est composé de quatre molécules de base appelées **nucléotides,** qui sont identiques à cela près que chacune contient une base azotée différente. Chaque nucléotide contient un groupement phosphate, un sucre (de type désoxyribose) et une des quatre bases (figure 11-4). En l'absence de groupement phosphate, la base et le désoxyribose forment un **nucléoside** au lieu d'un nucléotide. Les quatre bases sont l'**adénine,** la **guanine,** la **cytosine** et la **thymine.** Les noms complets des nucléotides sont le désoxyadénosine 5'-monophosphate (ou désoxyadénylate ou dAMP), le désoxyguanosine 5'-monophosphate (ou désoxyguanylate ou dGMP), le désoxycytidine 5'-monophosphate (ou désoxycytidylate ou dCMP) et le désoxythymidine 5'-monophosphate (ou désoxythymidilate, ou dTMP). Toutefois, il est plus pratique de se référer aux nucléotides par l'abréviation de leurs bases (A, G, C et T, respectivement). Deux de ces bases, l'adénine et la guanine, ont des structures similaires et sont appelées **purines.** Les deux autres, la cytosine et la thymine, se ressemblent également et sont appelées **pyrimidines.**

Une fois que le rôle de l'ADN dans l'hérédité devint clair, de nombreux chercheurs entreprirent de déterminer sa structure exacte. Comment une molécule contenant un nombre aussi limité de constituants différents pouvait-elle stocker l'énorme quantité d'information nécessaire pour décrire la structure primaire de toutes les protéines d'un organisme vivant ? Les premiers à proposer une structure plausible de l'ADN — Watson et Crick en 1953 — partirent de deux sortes d'indices. D'abord, Rosalind Franklin et Maurice Wilkins avaient amassé de nombreuses données de diffraction des rayons X au sujet de l'ADN. Dans ce type d'expériences, on dirige un faisceau de rayons X sur les chaînes d'ADN et la diffraction des rayons par ces chaînes est mise en évidence en les recevant sur un film photographique où ils produisent un certain nombre de taches. L'angle de diffraction que représente chaque tache visible sur le film fournit une indication quant à la position d'un atome ou de certains groupes d'atomes de la molécule d'ADN. Ce n'est pas une méthode facile à mettre en œuvre (ou à expliquer), et l'interprétation des taches est très difficile. Les informations disponibles à l'époque suggéraient que l'ADN était une molécule étroite et très longue comportant deux parties similaires disposées en parallèle tout le long de la molécule. Les données obtenues aux rayons X montrèrent que la molécule avait la forme d'une hélice (ou d'une spirale). D'autres éléments de régularité ressortaient de la disposition des taches dans les images de diffraction mais personne encore n'avait imaginé une structure tridimensionnelle capable de rendre compte de cet arrangement.

Le second type d'information dont disposaient Watson et Crick provenait du travail réalisé plusieurs années auparavant par Erwin Chargaff. En étudiant les ADN de divers organismes (voir le tableau 11-1), Chargaff avait établi des règles empiriques quant à la proportion des différents constituants de l'ADN :

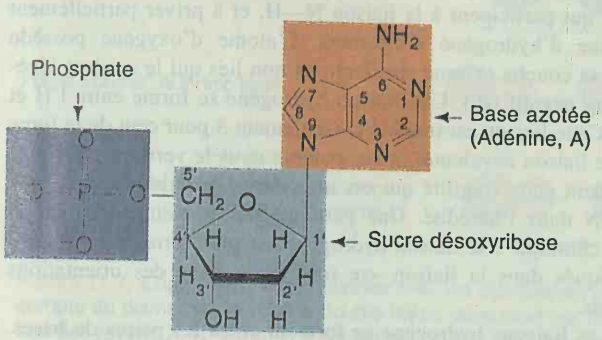
1. La quantité totale de nucléotides pyrimidiques (T + C) est toujours égale à la quantité totale de nucléotides puriques (A + G).

2. La quantité de T est toujours égale à la quantité de A, et la quantité de C égale à celle de G. Mais la quantité de A + T n'est pas nécessairement équivalente à la quantité de G + C, ainsi que le montre la dernière colonne du tableau 11-1. Ce rapport varie selon les organismes.

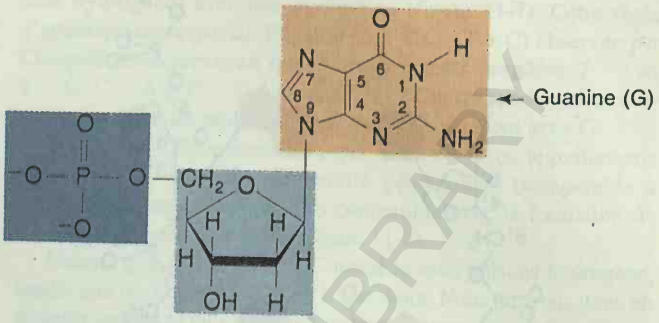
La double hélice

La structure dérivée de ces indices par Watson et Crick est une **double hélice** qui ressemble à l'entrelacement de deux ressorts. Chaque ressort (ou hélice) est une chaîne de nucléotides unis par des **liaisons phosphodiester,** dans laquelle un groupement phosphate forme un pont entre les groupements —OH de deux sucres adjacents. Les deux ressorts (ou hélices) sont maintenus ensemble par des **liaisons hydrogène,** où deux atomes électronégatifs se «partagent» un proton, entre les bases. Ces liaisons se forment

Nucléotides puriques

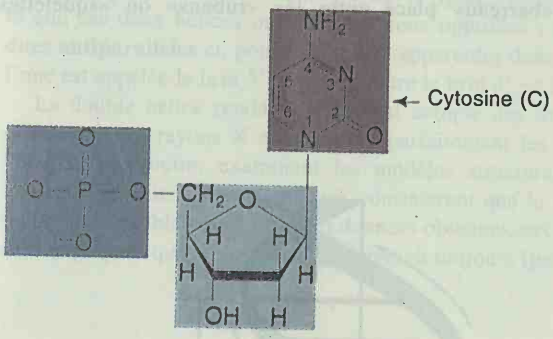


Désoxyadénosine 5'-monophosphate (dAMP)

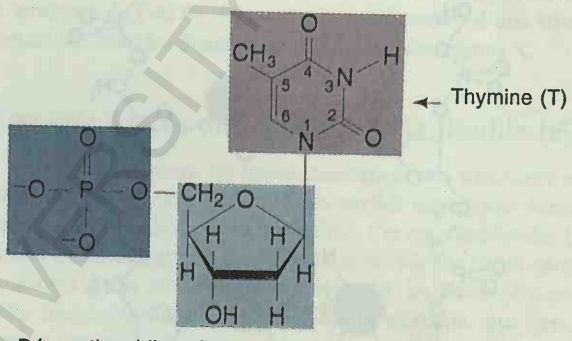


Désoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP)

Nucléotides pyrimidiques



Désoxycytidine 5'-monophosphate (dCMP)



Désoxythymidine 5'-monophosphate (dTMP)

Figure 11-4. Structure chimique des quatre nucléotides (deux contenant des bases puriques et deux contenant des bases pyrimidiques) qui sont les blocs de construction essentiels de l'ADN. Le sucre est appelé désoxyribose parce qu'il est une variante du ribose (celui-ci possède un atome d'oxygène supplémentaire).

Tableau 11-1. Compositions en bases* de l'ADN de diverses sources.

Organisme	Tissu	Adénine	Thymine	Guanine	Cytosine	$\frac{A+T}{G+C}$
Escherichia coli (K12)	—	26,0	23,9	24,9	25,2	1,00
Diplococcus pneumoniae	—	29,8	31,6	20,5	18,0	1,59
Mycobacterium tuberculosis	—	15,1	14,6	34,9	35,4	0,42
Levure	—	31,3	32,9	18,7	17,1	1,79
Paracentrotus lividus (oursin de mer)	Sperme	32,8	32,1	17,7	18,4	1,85
Hareng	Sperme	27,8	27,5	22,2	22,6	1,23
Rat	Moelle osseuse	28,6	28,4	21,4	21,5	1,33
Homme	Thymus	30,9	29,4	19,9	19,8	1,52
Homme	Foie	30,3	30,3	19,5	19,9	1,53
Homme	Sperme	30,7	31,2	19,3	18,8	1,62

*Exprimées en moles de constituants azotés par 100 moles de phosphate dans l'hydrolysat.
SOURCE : E. Chargaff et J. Davidson, eds. *The Nucleic Acids* . Academic Press, 1955.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

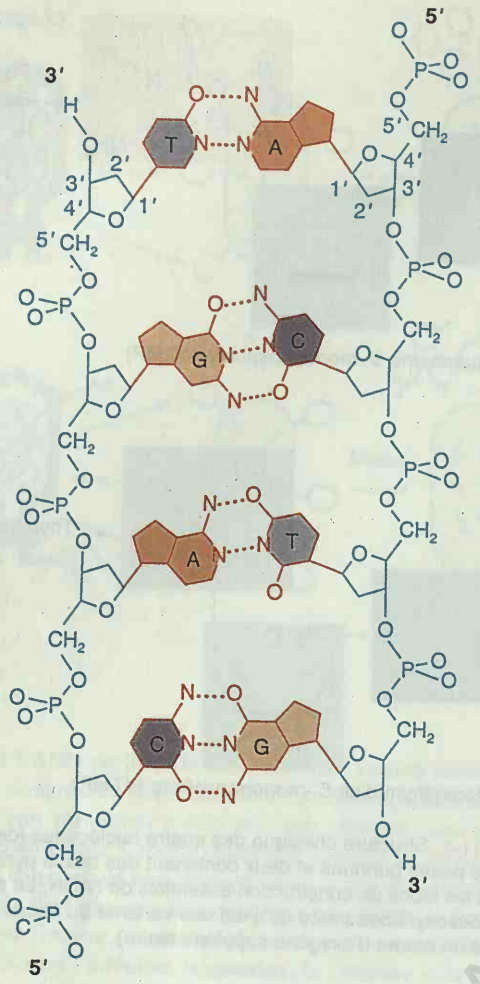
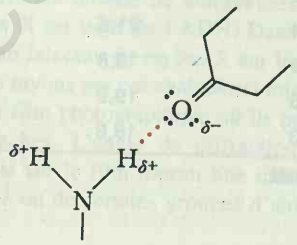


Figure 11-5. La double hélice de l'ADN déroulée pour montrer les squelettes des chaînes désoxyribose-phosphate et les barreaux formés par l'appariement des paires de bases. Les directions de ces chaînes sont opposées et leurs extrémités sont appelées 5' et 3' d'après l'orientation des atomes de carbone 5' et 3' des cycles du sucre. Chaque paire de bases comporte une base purique, adénine (A) ou guanine (G), et une base pyrimidique, thymine (T) ou cytosine (C), unies par des liaisons hydrogène (*pointillés*). (D'après R.E. Dickerson, «The DNA Helix and How It Is Read» Copyright © 1983 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés).

entre des atomes d'hydrogène portant une faible charge positive et des atomes accepteurs portant une faible charge négative. Par exemple :



Chaque atome d'hydrogène du groupement NH_2 est légèrement positif (δ^+) parce que l'atome d'azote a tendance à attirer les électrons qui participent à la liaison N—H, et à priver partiellement l'atome d'hydrogène d'électrons. L'atome d'oxygène possède dans sa couche externe six électrons non liés qui le rendent légèrement négatif (δ^-). Une liaison hydrogène se forme entre l'H et l'O. Cette liaison est très faible (seulement 3 pour cent de la force d'une liaison covalente), mais, comme nous le verrons, c'est précisément cette fragilité qui est importante pour le rôle que joue l'ADN dans l'hérédité. Une particularité supplémentaire sur le plan chimique : la liaison hydrogène est plus forte si les atomes impliqués dans la liaison «se font face» dans des orientations idéales.

Les liaisons hydrogène se forment entre les paires de bases, ainsi que le montrent les pointillés dans la figure 11-5 qui représente une partie de cette structure dont les hélices ont été déroulées. Chaque paire de bases comporte une base purique et une base pyrimidique appariées selon la règle suivante : un G s'apparie avec un C, et un A avec un T. La figure 11-6 montre une image simplifiée de l'hélice dans laquelle chaque paire de bases est représentée par un «barreau» placé entre les «rubans» ou «squelettes

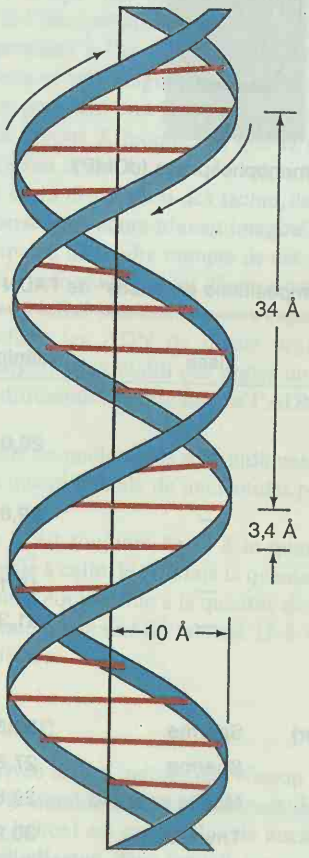


Figure 11-6. Modèle simplifié montrant la structure hélicoïdale de l'ADN. Les barreaux représentent les paires de bases et les rubans les squelettes des chaînes sucre-phosphate des deux chaînes antiparallèles. Les dimensions sont données en angströms (1 Å=0,1 nm).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITARA

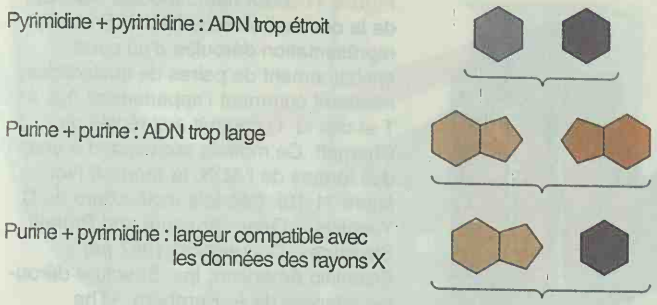


Figure 11-7. L'appariement des purines avec les pyrimidines rend compte du diamètre exact de la double hélice déterminé par diffraction des rayons X. (D'après R E Dickerson, «The DNA Helix and How It Is Read». Copyright © 1983 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

sucre-phosphate» des deux hélices. Dans la figure 11-5, on constate que ces deux hélices ont des directions opposées ; elles sont dites **antiparallèles** et, pour des raisons apparentes dans la figure, l'une est appelée le brin 5' → 3' et l'autre le brin 3' → 5'.

La double hélice rendait exactement compte des données de diffraction des rayons X et respectait parfaitement les règles de Chargaff. En outre, examinant les modèles structuraux qu'ils avaient construits, Watson et Crick constatèrent que la valeur du rayon de la double hélice tirée des données obtenues aux rayons X ne s'expliquait que si une purine s'appariait toujours (par des liaisons hydrogène) avec une pyrimidine (figure 11-7). Cette règle d'appariement respectait l'égalité (A + G) = (T + C) observée par Chargaff mais prévoyait quatre arrangements possibles T ··· A, T ··· G, C ··· A et C ··· G. Les résultats de Chargaff indiquaient toutefois que T se lie seulement avec A et C seulement avec G.

Watson et Crick montrèrent que seuls ces deux appariements aboutissent à une complémentarité géométrique (comparable à celle de la serrure avec sa clé) compatible avec la formation de liaisons hydrogène efficaces (figure 11-8).

Notons que le couple G – C possède trois liaisons hydrogène, tandis que le couple A – T n'en a que deux. Nous pouvons donc en déduire qu'un ADN contenant de nombreuses paires G – C sera plus stable que celui qui contient beaucoup de paires A – T, une déduction qui est aujourd'hui confirmée. Nous possédons maintenant une explication claire des observations de Chargaff en termes de structure de l'ADN (figure 11-9) et disposons d'une structure compatible avec les données de diffraction des rayons X.

Une vue à trois dimensions de la double hélice

A trois dimensions, les bases constituent des structures relativement plates et s'empilent les unes sur les autres pour former la structure en torsade de la double hélice. Cet empilement des bases accroît énormément la stabilité de la molécule par l'exclusion des molécules d'eau de l'espace compris entre les bases. (Ce phénomène ressemble beaucoup à la force d'adhésion que l'on sent lorsque, après avoir pressé deux plaques de verre l'une contre l'autre sous l'eau, on cherche ensuite à les séparer). Plus tard, on a réalisé qu'il existait deux formes d'ADN dans les brins analysés

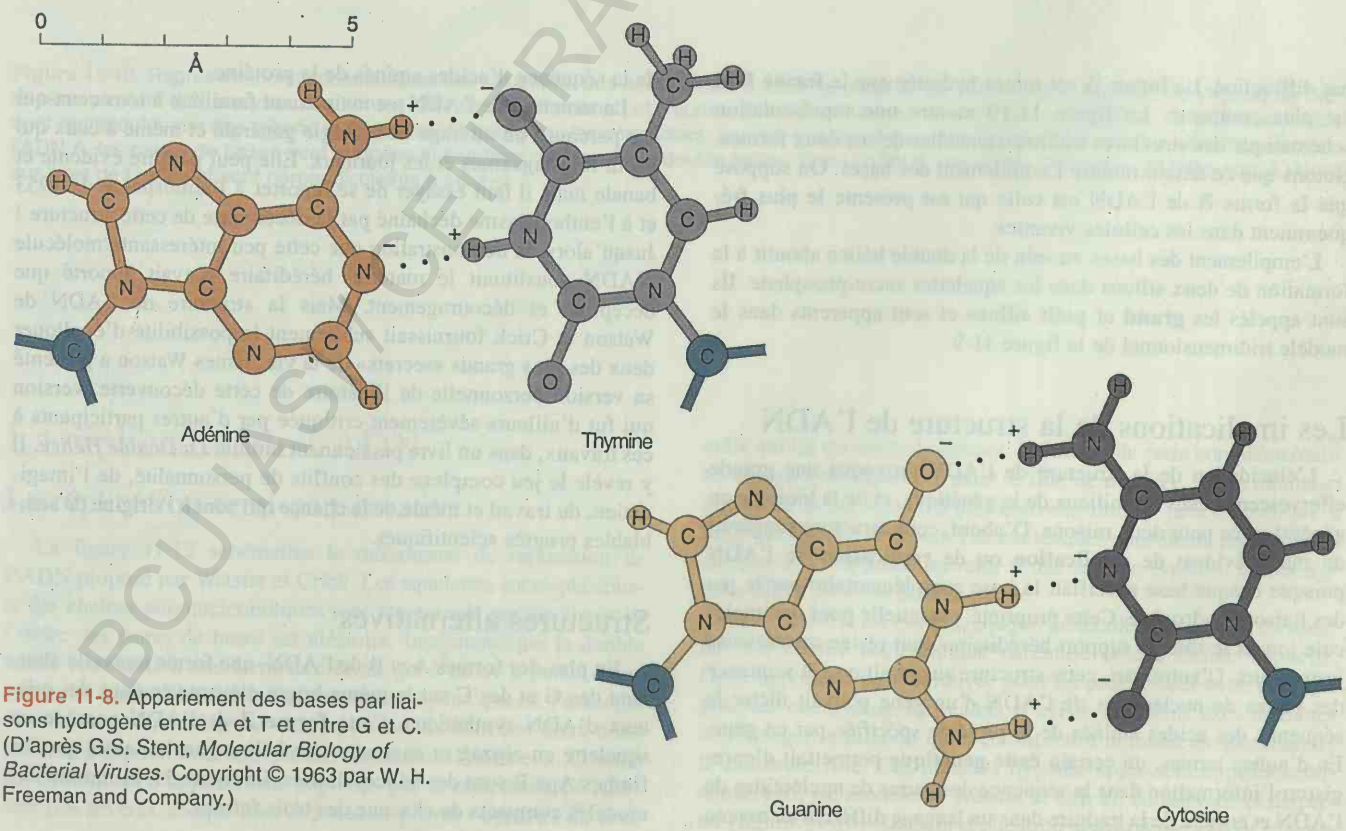


Figure 11-8. Appariement des bases par liaisons hydrogène entre A et T et entre G et C. (D'après G.S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. Copyright © 1963 par W. H. Freeman and Company.)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITARA

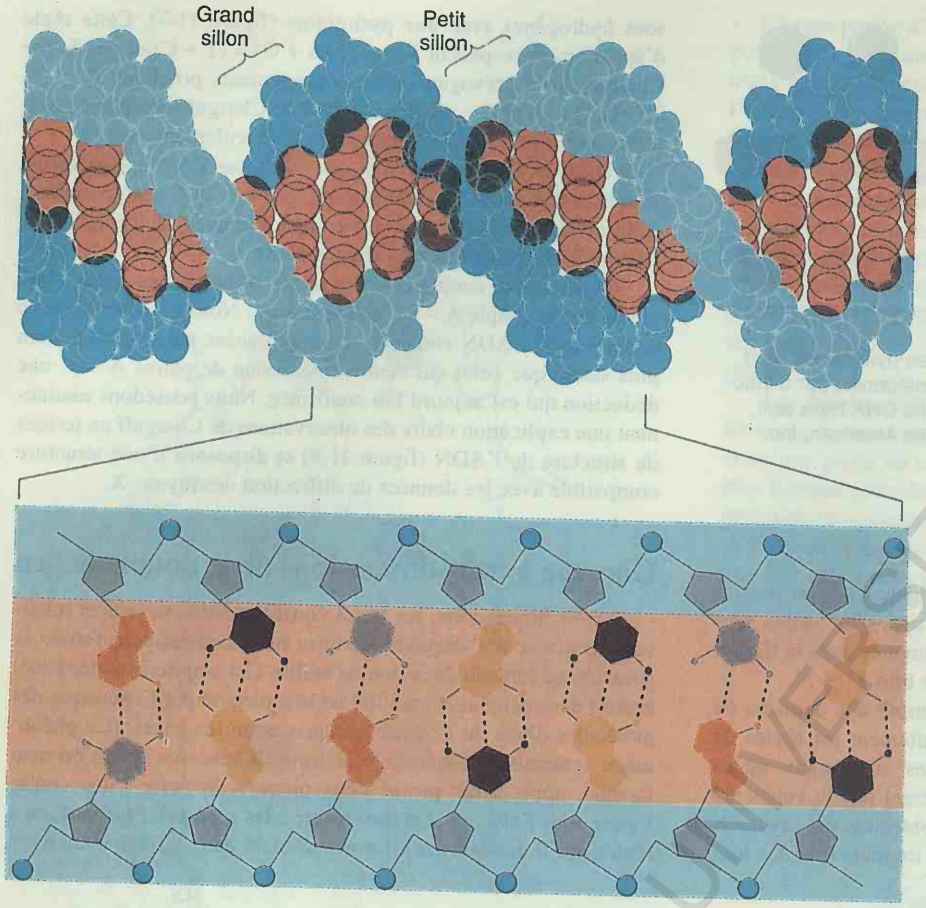


Figure 11-9. *En haut* : Modèle compact de la double hélice de l'ADN. *En bas* : représentation déroulée d'un court enchaînement de paires de nucléotides, montrant comment l'appariement des A–T et des G–C conduit aux règles de Chargaff. Ce modèle correspond à une des formes de l'ADN, la *forme B* (voir figure 11-10). (Modèle moléculaire de C. Yanofsky, «Gene Structure and Protein Structure». Copyright © 1967 par Scientific American, Inc. Structure déroulée adaptée de A. Kornberg, «The Synthesis of DNA». Copyright © 1968 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

par diffraction. La **forme A** est moins hydratée que la **forme B** et est plus compacte. La figure 11-10 montre une représentation schématique des structures tridimensionnelles de ces deux formes. Notons que ce dessin montre l'empilement des bases. On suppose que la forme B de l'ADN est celle qui est présente le plus fréquemment dans les cellules vivantes.

L'empilement des bases au sein de la double hélice aboutit à la formation de deux sillons dans les squelettes sucre-phosphate. Ils sont appelés les **grand** et **petit sillons** et sont apparents dans le modèle tridimensionnel de la figure 11-9.

Les implications de la structure de l'ADN

L'élucidation de la structure de l'ADN provoqua une grande effervescence dans les milieux de la génétique, et de la biologie en général, et ce pour deux raisons. D'abord, cette structure suggérait un mode évident de **duplication** ou de **réplication** de l'ADN puisque chaque base spécifiait la base complémentaire par le jeu des liaisons hydrogène. Cette propriété, essentielle pour une molécule jouant le rôle de support héréditaire, était restée mystérieuse jusqu'alors. D'autre part, cette structure suggérait que la *séquence* des paires de nucléotides de l'ADN d'un gène pouvait dicter la séquence des acides aminés de la protéine spécifiée par ce gène. En d'autres termes, un certain **code génétique** permettait d'enregistrer l'information dans la séquence des paires de nucléotides de l'ADN et ensuite de la traduire dans un langage différent au niveau de la séquence d'acides aminés de la protéine.

La structure de l'ADN est maintenant familière à tous ceux qui ont parcouru un ouvrage de biologie générale et même à ceux qui lisent les magazines et les journaux. Elle peut paraître évidente et banale mais il faut essayer de se reporter à l'atmosphère de 1953 et à l'enthousiasme déchaîné par la découverte de cette structure ! Jusqu'alors, la démonstration que cette peu intéressante molécule d'ADN constituait le matériel héréditaire n'avait apporté que déception et découragement. Mais la structure de l'ADN de Watson et Crick fournissait subitement la possibilité d'expliquer deux des plus grands «secrets» de la vie. James Watson a présenté sa version personnelle de l'histoire de cette découverte, version qui fut d'ailleurs sévèrement critiquée par d'autres participants à ces travaux, dans un livre passionnant intitulé *La Double Hélice*. Il y révèle le jeu complexe des conflits de personnalité, de l'imagination, du travail et même de la chance qui sont à l'origine de semblables progrès scientifiques.

Structures alternatives

En plus des formes A et B de l'ADN, une forme nouvelle alternant des G et des C sur le même brin a été trouvée dans des cristaux d'ADN synthétique. Cette **forme Z** de l'ADN possède un squelette en zigzag et engendre une hélice gauche, alors que les formes A et B sont des hélices droites. La figure 11-11 montre des modèles compacts de chacune des trois formes.

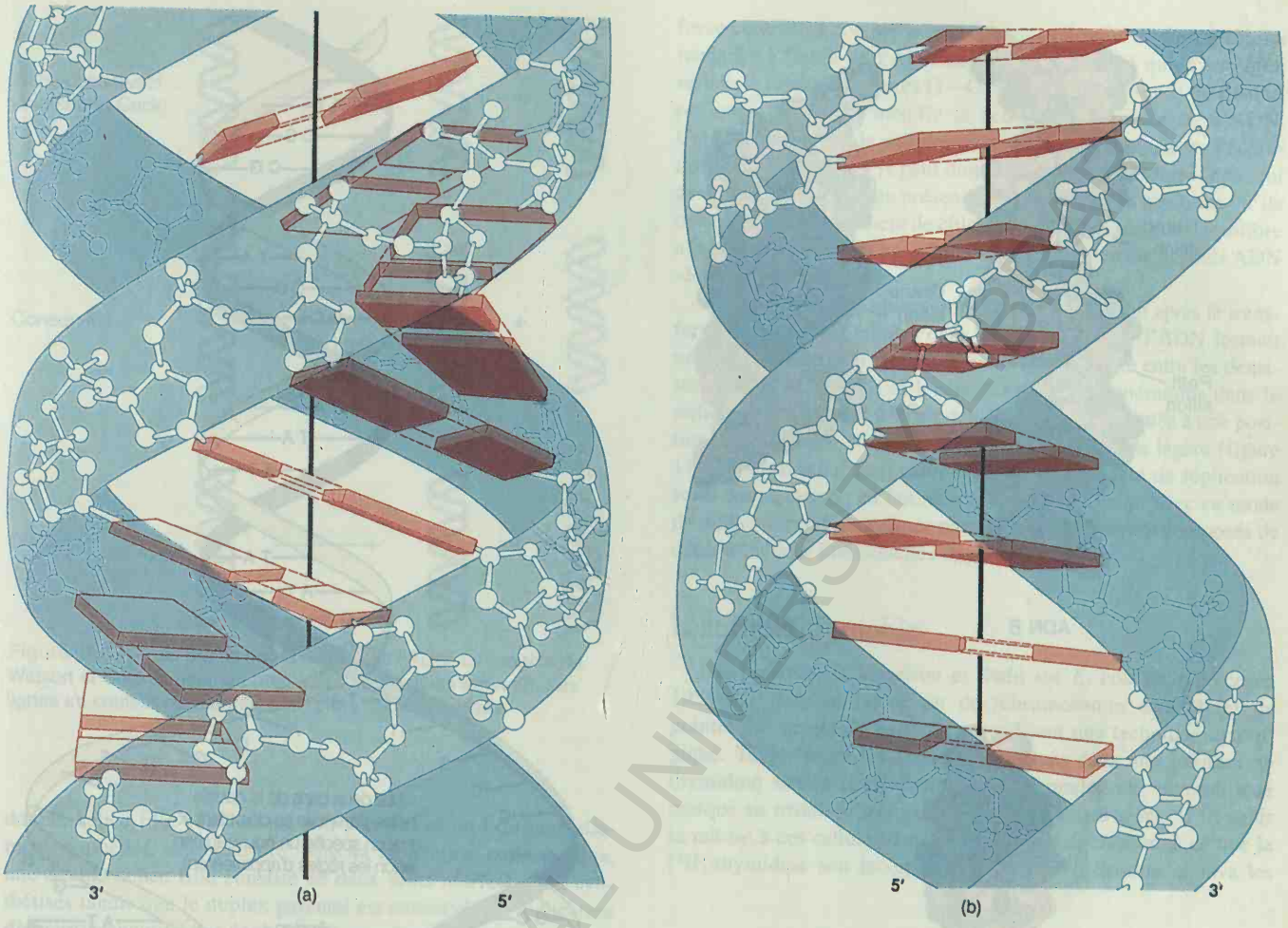


Figure 11-10. Représentations schématiques des structures des deux formes d'ADN. (a) ADN A. (b) ADN B. Le fondement conceptuel de ces dessins provient des analyses des brins d'ADN de Struther Arnott et d'autres. Les squelettes des chaînes sucre-phosphate de la double hélice sont représentés par des rubans et les paires de bases qui les connectent, comme des échelons, sont représentées par des planches. Dans l'ADN A, les paires de bases sont inclinées et écartées de l'axe de la double hélice. Dans l'ADN B, par contre, les paires de base sont à cheval sur l'axe de l'hélice et sont perpendiculaires à celui-ci.

La réplication de l'ADN

La réplication semi-conservative

La figure 11-12 schématise le mécanisme de réplication de l'ADN proposé par Watson et Crick. Les squelettes sucre-phosphate des chaînes polynucléotidiques sont représentés par des lignes et l'ordre des paires de bases est aléatoire. Imaginons que la double hélice ressemble à une fermeture éclair qui s'ouvre à partir d'une extrémité (dans le bas de la figure). Nous voyons que, si l'analogie avec la fermeture éclair est exacte, le déroulement des deux brins aboutira à exposer des bases isolées sur chacun d'entre eux. Comme les contraintes d'appariement imposées par la structure de l'ADN sont très sévères, chaque base exposée ne pourra s'apparier qu'avec celle qui lui est complémentaire. En raison de cette complémentarité, chaque brin séparé va jouer le rôle de **matrice,** ou de moule, et permettra la formation d'une nouvelle double hélice identique à celle qui existait au départ. Les nucléotides constituant les nouvelles chaînes sont supposés provenir d'une réserve («pool») de nucléotides libres présents dans la cellule.

Si ce modèle est correct, chaque molécule fille devrait comporter une chaîne nucléotidique parentale et une chaîne nouvelle. Cette hypothèse a été éprouvée pour les procaryotes aussi bien que pour les eucaryotes. En réalité, il existe au moins trois manières d'envisager la relation qui s'établit entre la molécule parentale et la molécule fille. Ces modèles hypothétiques sont appelés semi-conservatif (le modèle de Watson et Crick), conservatif et dispersif (figure 11-13). Dans la réplication **semi-conservative,** chaque

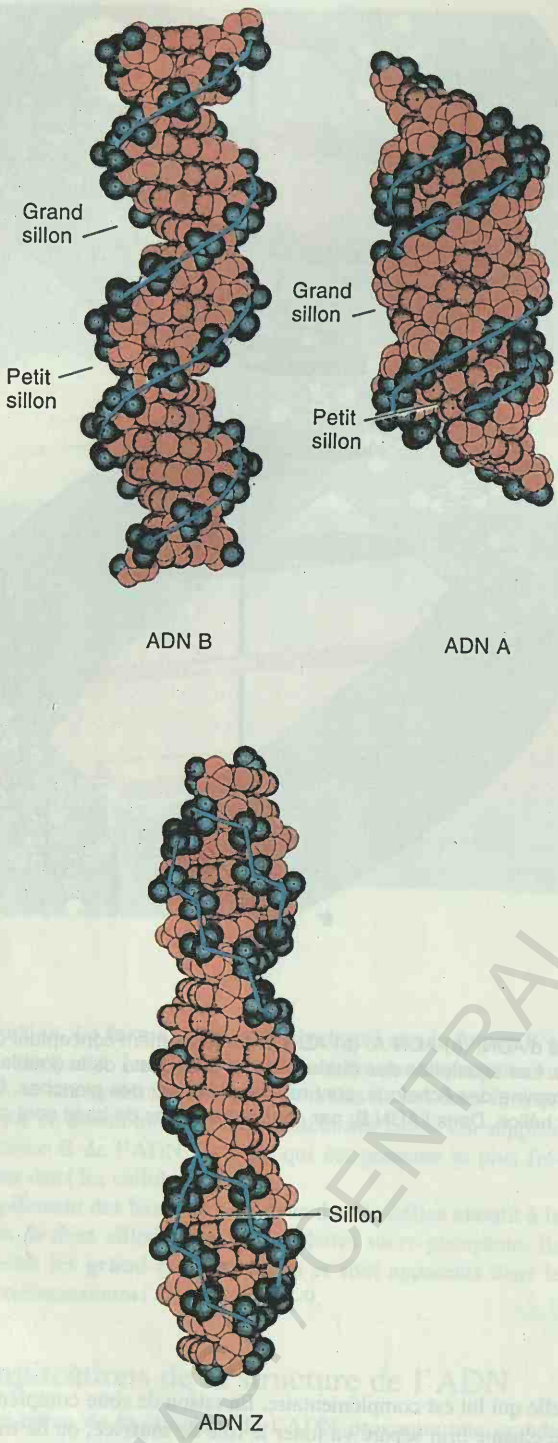


Figure 11-11. Modèles compacts des ADN B (*à gauche*), A (*à droite*) et Z (*en bas*). (D'après A. Kornberg et T. A. Baker, «*DNA Replication*», 2ième éd. Copyright © 1992 par W. H. Freeman and Company.)

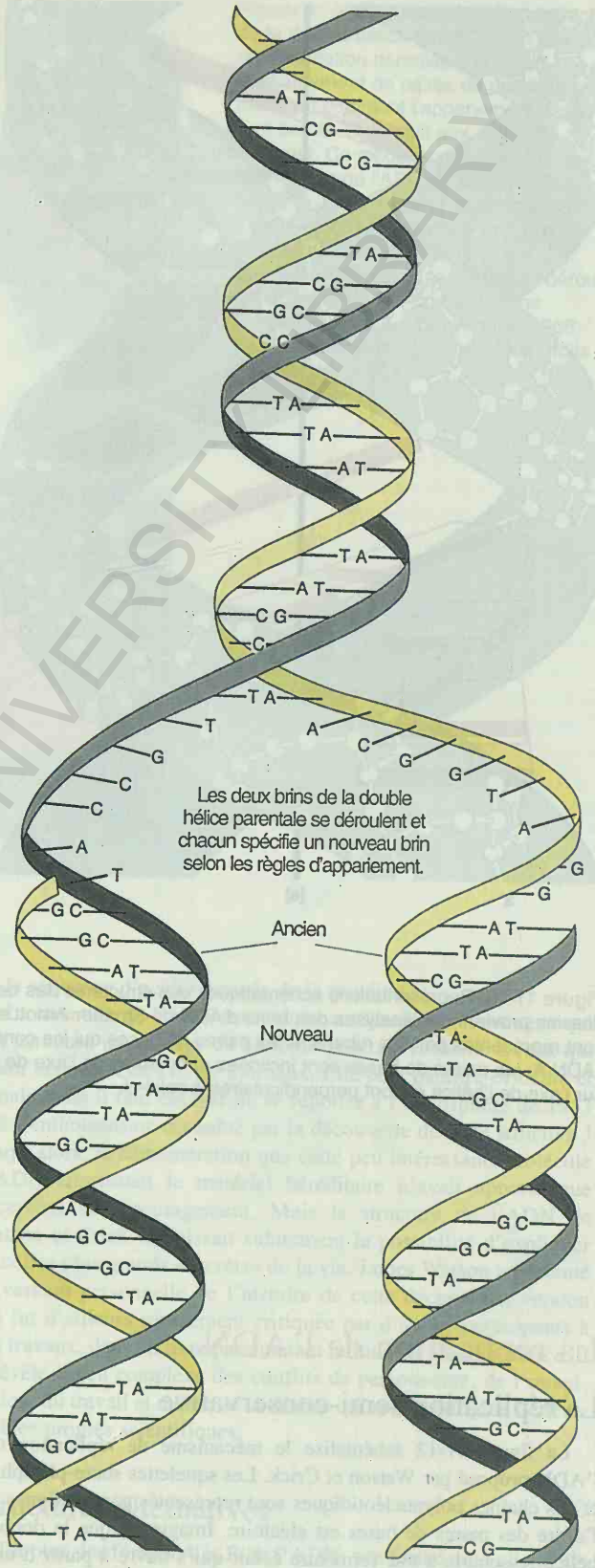


Figure 11-12. Le modèle de réplication de l'ADN proposé par Watson et Crick repose sur la spécificité des liaisons hydrogène entre paires de base. Les chaînes complémentaires ont des couleurs différentes.

BUJIAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

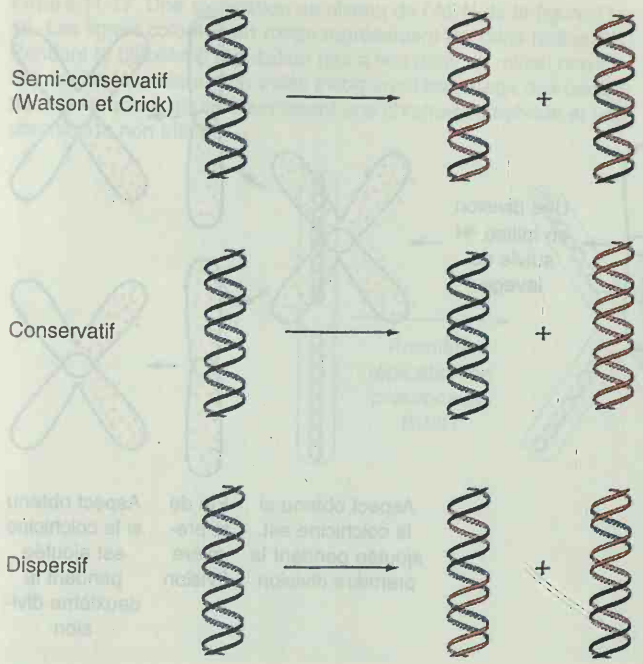


Figure 11-13. Trois profils de réplication de l'ADN. Le modèle de Watson et Crick conduit au premier profil (semi-conservatif). Les lignes en couleur représentent les brins néo-synthétisés.

double hélice fille contient un brin parental et un brin nouvellement synthétisé. Au contraire, dans la réplication **conservative,** une double hélice fille consiste en deux brins nouvellement synthétisés tandis que le duplex parental est conservé. La réplication **dispersive** aboutit à des doubles hélices qui ne comportent que des *segments* d'ADN parental et d'ADN nouvellement synthétisé.

L'expérience de Meselson et Stahl

En 1958, Matthews Meselson et Franklin Stahl imaginèrent une expérience qui permettait de faire la distinction entre ces possibilités. Ils cultivèrent des cellules d'*E. coli* dans un milieu contenant l'isotope lourd de l'azote (^{15}N) au lieu de la forme légère normale (^{14}N). Cet isotope fut incorporé dans les bases azotées et ensuite dans les nouveaux brins d'ADN synthétisés. Après un grand nombre de divisions cellulaires en présence de ^{15}N, tout l'ADN de ces cellules était marqué par l'isotope lourd. Les cellules furent ensuite séparées du milieu au ^{15}N et transférées dans un milieu au ^{14}N et des échantillons prélevés après une et deux divisions cellulaires. L'ADN fut extrait des cellules de chacun de ces échantillons, dissous dans une solution de chlorure de césium (CsCl) et introduit dans une ultracentrifugeuse.

Lorsque le chlorure de césium est centrifugé à très haute vitesse (50.000 r.p.m.) pendant plusieurs heures, les ions césium et chlorure migrent vers le fond du tube sous l'action de la force centrifuge. Finalement, un **gradient** d'ions Cs^+ et Cl^- s'établit dans le tube, avec la concentration la plus élevée dans le fond. Les molécules d'ADN de la solution sont également poussées par la force centrifuge. Pendant leur trajet vers le fond, elles rencontrent des concentrations croissantes de sels qui les repoussent vers le haut en raison de la densité de flottaison (ou tendance à flotter) de l'ADN. Celui-ci s'arrête finalement à l'endroit du gradient où la force centrifuge compense exactement sa densité de flottaison. La tendance à flotter de l'ADN dépend de sa densité qui, à son tour, reflète le rapport de paires G – C et A – T. La présence de l'isotope lourd de l'azote modifie la densité de flottaison de l'ADN. Celui qui provient de cellules cultivées pendant plusieurs générations dans le milieu ^{15}N peut donc être distingué aisément de celui des cellules cultivées en présence de ^{14}N grâce aux positions qu'ils occupent dans le gradient de chlorure de césium lorsque l'équilibre a été atteint. De tels échantillons sont habituellement appelés ADN «lourd» et «léger».

Meselson et Stahl observèrent qu'une génération après le transfert des molécules lourdes dans le milieu au ^{14}N, l'ADN formait une seule bande dont la densité était intermédiaire entre les densités des témoins lourds et légers. Après deux générations dans le milieu au ^{14}N, l'ADN formait deux bandes, l'une située à une position intermédiaire, l'autre à la position de la bande légère (figure 11-14). Ce résultat était celui prédit par le modèle de réplication semi-conservative ; en fait, il *n'*était compatible *qu'*avec ce mode de réplication *si* l'expérience partait de chromosomes composés de doubles hélices individuelles (figure 11-15).

L'autoradiographie

L'expérience de Meselson et Stahl sur *E. coli* fut répétée en 1958 par Herbert Taylor sur des chromosomes de cellules de pointes de racines de haricots, en utilisant une technique cytologique. Taylor plaça les cellules de racines dans une solution de thymidine tritiée ([^{3}H]-thymidine)—le nucléoside thymidilique marqué au *tritium*, l'isotope radioactif de l'hydrogène. Il fit subir la mitose à ces cellules dans cette solution de manière à ce que la [^{3}H]-thymidine soit incorporée dans l'ADN. Ensuite, il lava les

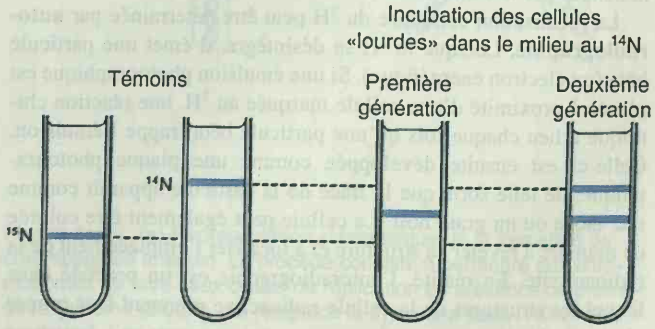


Figure 11-14. Centrifugation de l'ADN en gradient de chlorure de césium (CsCl). Des cellules cultivées pendant de nombreuses générations dans des milieux à base d'azote ^{15}N ou d'azote ^{14}N fournissent les témoins pour la position des bandes «lourde» et «légère». Lorsque les cellules cultivées en milieu ^{15}N sont transférées dans le milieu ^{14}N, la première génération fournit une bande d'ADN occupant une position intermédiaire et la seconde génération deux bandes : l'une intermédiaire et l'autre légère.

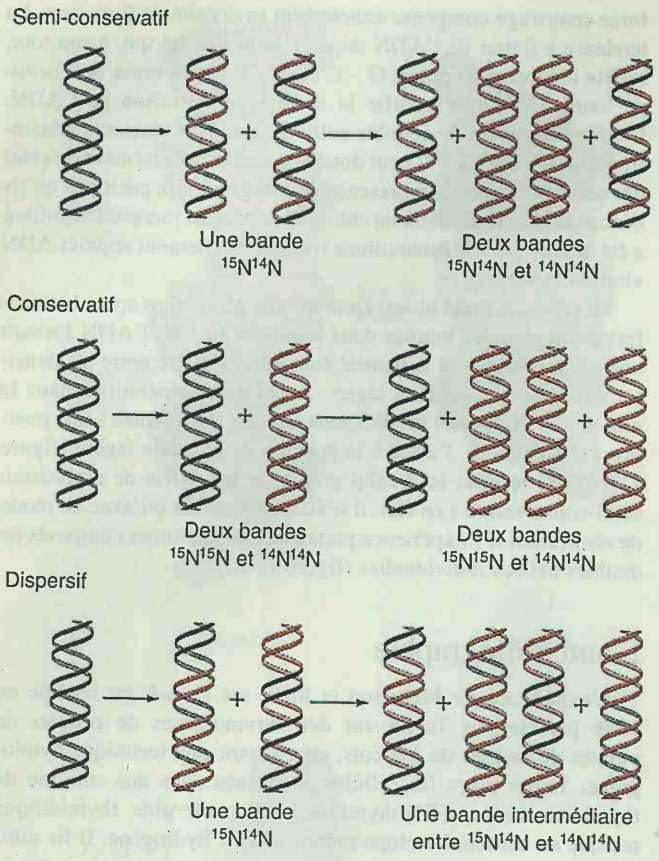


Figure 11-15. Seul le modèle semi-conservatif de réplication de l'ADN prévoit des résultats comme ceux de la figure 11-14 : une bande intermédiaire unique à la première génération, et une bande intermédiaire et une bande légère à la seconde. (Voir la figure 11-13 pour la signification des symboles).

pointes et les transféra dans une solution contenant de la thymidine non radioactive. L'addition de colchicine à cette préparation inhibe la formation du fuseau et par conséquent la séparation des chromosomes lors de la métaphase ; les chromatides filles restent attachées par le centromère.

La localisation cellulaire du ^{3}H peut être déterminée par **autoradiographie.** Lorsque le ^{3}H se désintègre, il émet une particule bêta (un électron énergétique). Si une émulsion photographique est placée à proximité d'une cellule marquée au ^{3}H, une réaction chimique a lieu chaque fois qu'une particule béta frappe l'émulsion. Celle-ci est ensuite développée comme une plaque photographique, de telle sorte que la trace de la particule apparaît comme une tache ou un grain noir. La cellule peut également être colorée de manière à révéler sa structure et à localiser l'emplacement de la radioactivité. En réalité, l'autoradiographie est un procédé dans lequel les structures de la cellule radioactive prennent leur propre photographie.

La figure 11-16 montre les résultats obtenus selon que la colchicine est ajoutée au cours de la première division en présence de [^{3}H]-thymidine ou l'est au cours de la division mitotique suivante. Il est possible d'interpréter ces résultats en représentant chaque chromatide comme une molécule unique d'ADN qui se réplique de manière semi-conservative (figure 11-17).

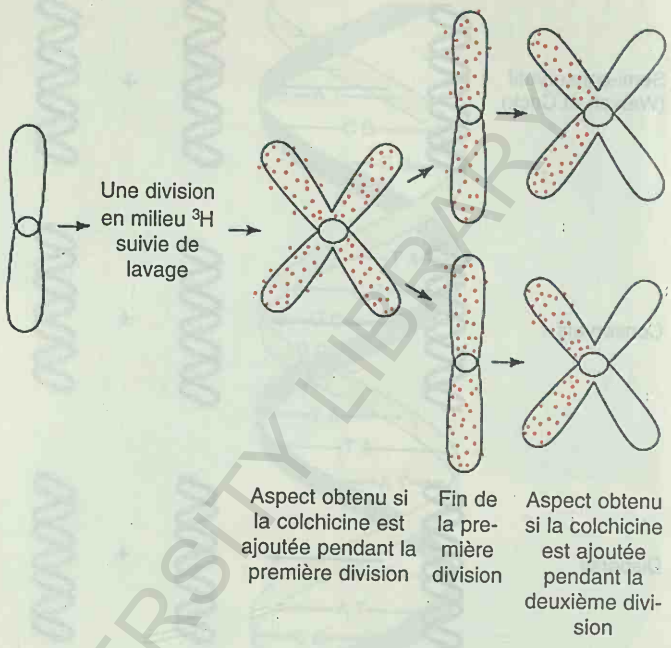


Figure 11-16. Représentation schématique de l'autoradiographie de chromosomes de cellules cultivées pendant une division cellulaire en présence de l'isotope radioactif ^{3}H (tritium) de l'hydrogène et cultivées ensuite pour une deuxième division mitotique dans un milieu non radioactif. Chaque point représente la trace d'une particule radioactive.

Les chromosomes arlequin

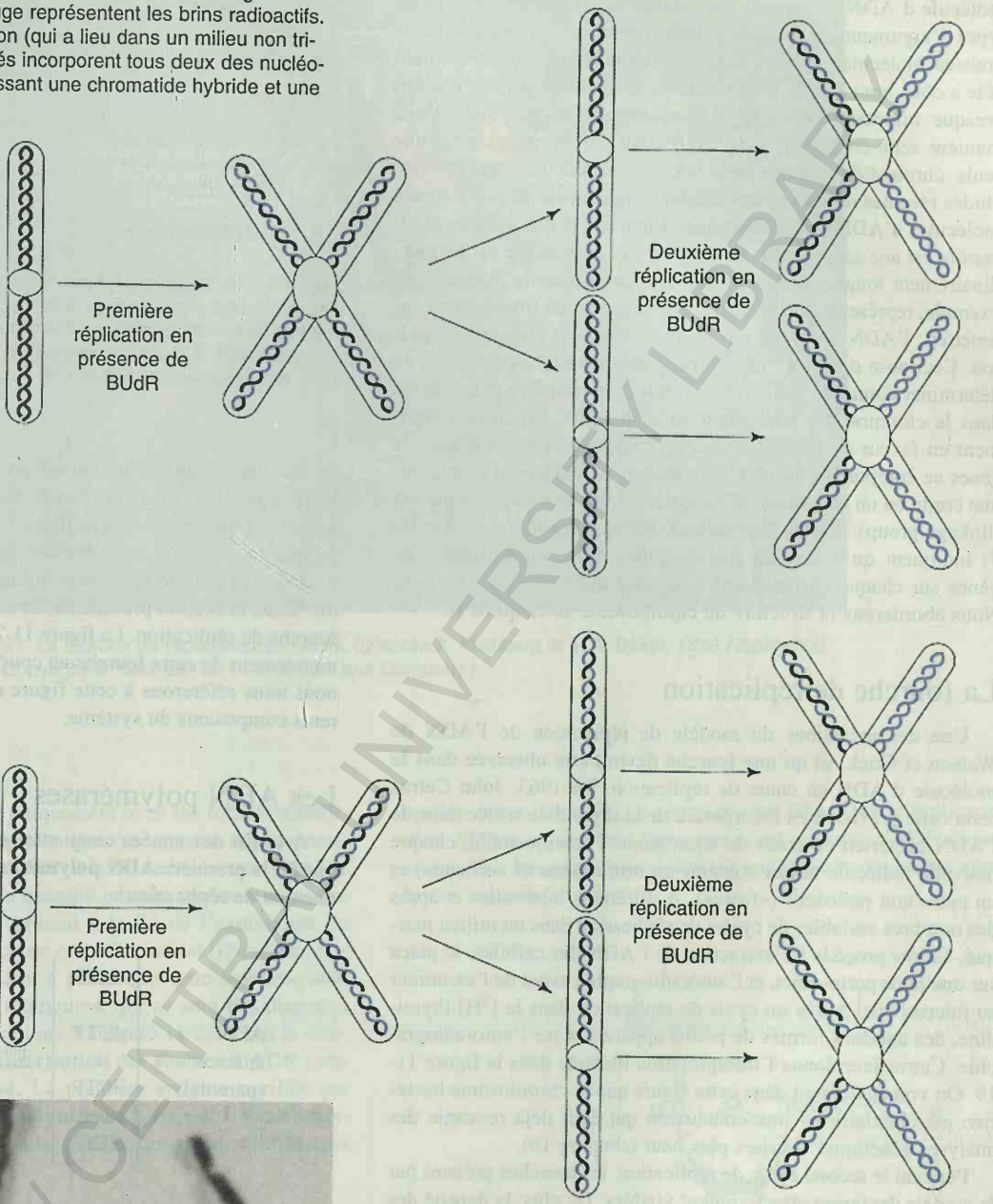
En utilisant une technique de coloration plus moderne, il devient possible de visualiser la réplication semi-conservative du chromosome au cours de la mitose sans l'aide de l'autoradiographie. Dans ce procédé, on laisse les chromosomes faire deux cycles de réplication en présence de bromodésoxyuridine (BUdR). Le profil de marquage à la BUdR montré dans la figure 11-18a est la réciproque de celle de la figure 11-17, puisque BUdR est présent pendant les deux réplications au lieu d'être remplacé par de la thymidine normale pour la deuxième réplication comme dans le procédé autoradiographique. Les chromosomes sont ensuite marqués avec un colorant fluorescent et avec le colorant de Giemsa ; ce procédé fait une distinction entre les chromatides hybrides comportant un brin contenant de la BUdR et un brin initial (coloration foncée) et celles dont les deux brins contiennent de la BUdR (sans coloration), et produit ce qu'on appelle des **chromosomes arlequin** (figure 11-18b). (Notons que les chromosomes arlequin conviennent particulièrement bien pour la détection des échanges entre chromatides filles à la mitose ; deux exemples sont montrés dans la figure 11-18b). En utilisant des techniques similaires, Taylor a montré que la réplication des chromosomes à la méiose est également semi-conservative.

La structure du chromosome

Les figures 11-16 et 11-17 abordent une question importante de la génétique : le chromosome eucaryotique correspond-il à une

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 11-17. Une explication au niveau de l'ADN de la figure 11-16. Les lignes colorées en rouge représentent les brins radioactifs. Pendant la deuxième réplication (qui a lieu dans un milieu non tritié), les brins tritiés et non tritiés incorporent tous deux des nucléotides non radioactifs en fournissant une chromatide hybride et une chromatide non tritiée.



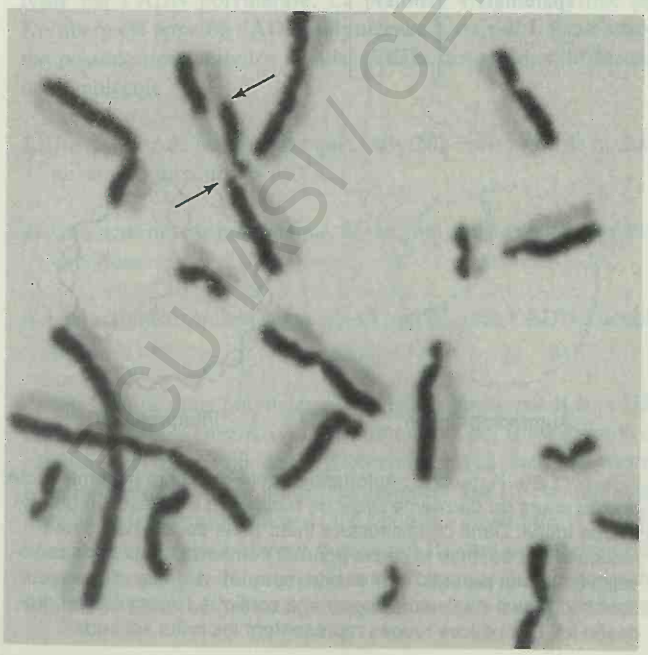


Figure 11-18. (a) Représentation schématique de la formation de chromosomes arlequin. Le procédé consiste à permettre aux chromosomes de faire deux cycles de réplication en présence de bromodésoxyuridine (BUdR), qui remplace la thymidine dans l'ADN néosynthétisé. Les chromosomes sont ensuite traités avec un colorant fluorescent et avec le colorant de Giemsa en produisant l'aspect montré. (Les lignes rouges représentent les brins substitués au BUdR.) (b) Photographie de chromosomes arlequin dans une cellule d'ovaire de hamster chinois (CHO). Les chromatides dont les deux brins contiennent du BUdR sont claires sur la photo tandis que celles qui possèdent un brin contenant du BUdR et un brin initial sont foncées. Un chromosome (voir les flèches dans le haut de la figure) montre un double échange de chromatides. (Photographie due à l'amabilité de Sheldon Wolff et Judy Bodycote).

ACU/ASU / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

molécule d'ADN unique entourée d'une matrice protéique ? Deux types d'arguments le suggèrent. Tout d'abord, s'il y avait de nombreuses molécules d'ADN dans le chromosome (qu'elles soient côte à côte, bout à bout ou orientées de manière aléatoire), il serait presque impossible pour le chromosome de se répliquer d'une manière semi-conservative (se traduisant par le marquage d'une seule chromatide comme dans les expériences de Taylor). Des études récentes relatives à des chromosomes isolés et à de longues molécules d'ADN s'accordent avec l'hypothèse que *chaque chromatide est une seule molécule d'ADN.* Cette molécule est extraordinairement longue. L'ADN d'un seul chromosome humain, par exemple, représente, s'il est étiré, une longueur de trois à cinq centimètres ; l'ADN d'un seul noyau a une longueur d'un mètre environ. Ceci pose d'ailleurs une autre question intéressante, celle de déterminer comment cette énorme molécule peut être empaquetée dans le chromosome sans gêner sa réplication. Un second argument en faveur de l'hypothèse de la molécule unique est que les gènes se comportent comme s'ils étaient attachés bout à bout sur une corde ou un fil unique que nous appelons un *groupe de liaison* (linkage group). Toutes les données de liaison génétique (chapitre 5) indiquent qu'il ne faut rien de plus qu'une suite linéaire de gènes sur chaque chromosome pour expliquer les faits observés. Nous aborderons la structure du chromosome au chapitre 16.

La fourche de réplication

Une des prévisions du modèle de réplication de l'ADN de Watson et Crick est qu'une fourche devrait être observée dans la molécule d'ADN en cours de réplication. En 1963, John Cairns testa cette prévision en incorporant de la thymidine tritiée dans de l'ADN bactérien en cours de réplication. Théoriquement, chaque nouvelle molécule devait contenir un brin radioactif («chaud») et un autre non radioactif («froid»). A différents intervalles et après des nombres variables de cycles de réplication dans un milieu marqué, Cairns procéda à l'extraction de l'ADN des cellules, le placa sur une lame porte-objet, et l'autoradiographia avant de l'examiner au microscope. Après un cycle de réplication dans la [^{3}H]-thymidine, des anneaux formés de points apparurent sur l'autoradiographie. Cairns leur donna l'interprétation illustrée dans la figure 11-19. On voit également dans cette figure que le chromosome bactérien est circulaire — une conclusion qui était déjà ressortie des analyses génétiques décrites plus haut (chapitre 10).

Pendant le second cycle de réplication, les fourches prévues par le modèle devinrent effectivement visibles. De plus, la densité des grains dans les trois segments mena à l'interprétation montrée dans la figure 11-20. Cairns observa des profils autoradiographiques en forme de croissants de lune de toutes tailles, correspondant au déplacement progressif de la fourche de réplication autour de l'anneau. Les structures du type de celle montrée dans la figure 11-20 sont appelées des **structures thêta (θ).**

Le mécanisme de la réplication de l'ADN

Watson et Crick supposèrent initialement que c'était l'appariement des bases complémentaires qui constituait le fondement de la fidélité de la réplication de l'ADN, c'est-à-dire que chaque base du brin servant de matrice déterminait la base complémentaire du nouveau brin. Mais nous savons maintenant que la réplication de

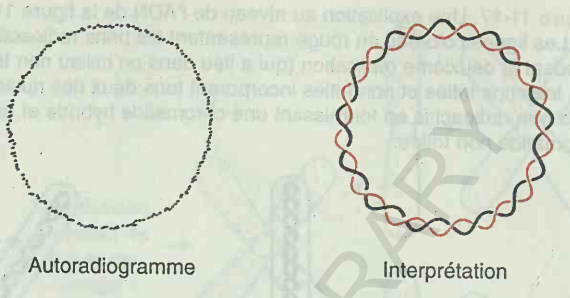
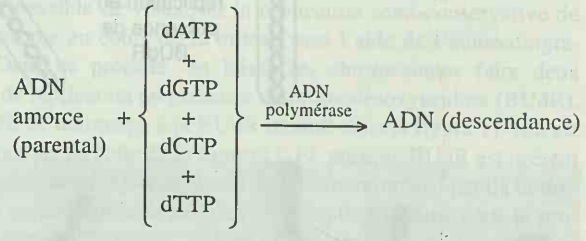


Figure 11-19. *A gauche :* Autoradiographie d'un chromosome bactérien après une réplication en présence de thymidine tritiée. Selon le modèle semi-conservatif de réplication, un des deux brins devrait être radioactif. *A droite* : Interprétation de l'autoradiographie. La ligne rouge représente le brin tritié.

l'ADN est un processus complexe qui exige la participation de nombreux composants différents. Examinons chacun de ces composants et voyons comment ils s'assemblent pour produire l'image que nous avons actuellement de la synthèse de l'ADN chez *Escherichia coli,* le système cellulaire de réplication le mieux étudié. Dans la section précédente, nous avons introduit le concept de fourche de réplication. La figure 11-21 offre un schéma détaillé du mouvement de cette fourche au cours de la réplication de l'ADN ; nous nous référerons à cette figure en passant en revue les différents composants du système.

Les ADN polymérases

A la fin des années cinquante, Arthur Kornberg a identifié et purifié la première **ADN polymérase,** une enzyme qui catalyse la réaction de réplication :



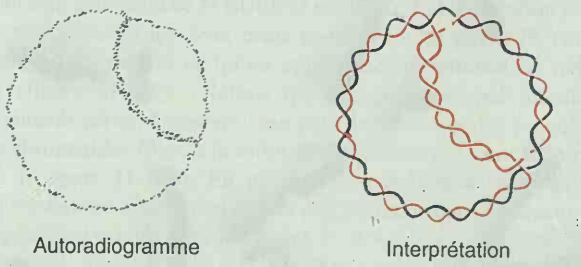


Figure 11-20. *A gauche :* Autoradiographie d'un chromosome bactérien au cours du deuxième cycle de réplication en présence de thymidine tritiée. Dans cette structure thêta (θ) la double hélice néo-répliquée qui traverse le cercle pourrait comporter deux brins radioactifs (si le brin parental était le brin marqué). *A droite :* l'épaisseur double du tracé de l'autoradiogramme confirme l'interprétation proposée ici. Les hélices rouges représentent les brins «chauds».

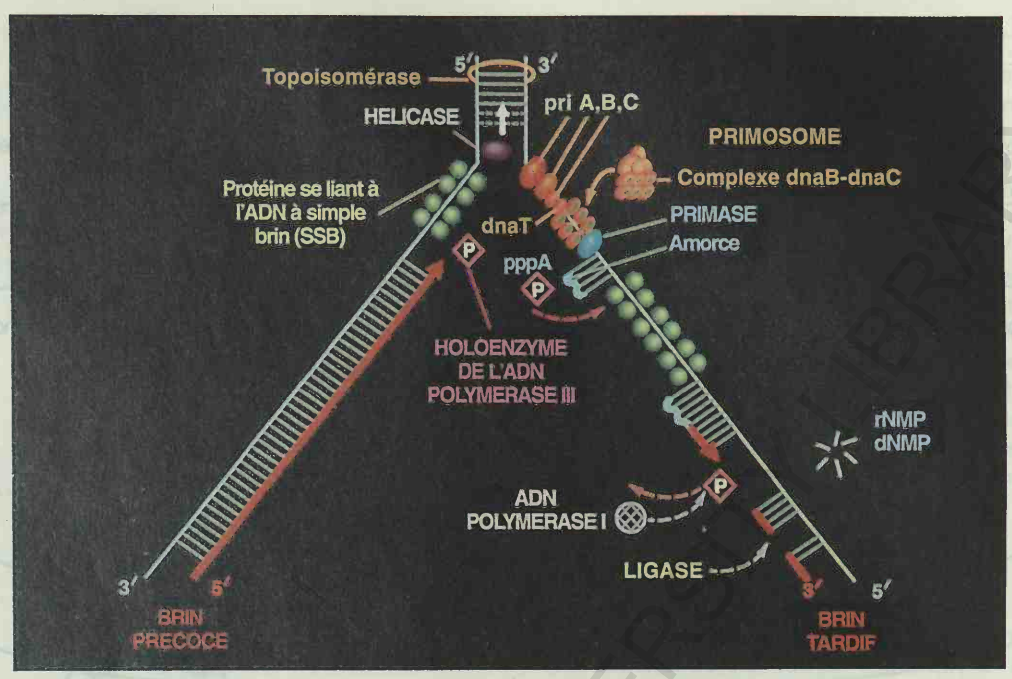


Figure 11-21. La fourche de réplication de l'ADN. (D'après A. Kornberg et T. A. Baker, *DNA Replication*, 2ième éd. Copyright © 1992 par W. H. Freeman and Company.)

Cette réaction fonctionne uniquement avec les formes triphosphate des nucléotides (telle que le désoxyadénosine triphosphate, ou dATP). La quantité totale d'ADN à la fin de la réaction peut être jusqu'à 20 fois supérieure à la quantité initiale, montrant ainsi que la majeure partie de l'ADN présent à la fin de l'expérience est constituée par la descendance de cet ADN initial. (Note des traducteurs : il n'était pas évident à priori que cette synthèse était fidèle mais des expériences ultérieures, qui ne sont pas discutées ici, en fournirent la démonstration). La figure 11-22 décrit la réaction d'élongation ou de **polymérisation** des chaînes d'ADN catalysée par l'ADN polymérase. La première enzyme purifiée par Kornberg est appelée l'**ADN polymérase I**, ou **pol I**. Cette enzyme possède trois activités localisées dans des régions différentes de la molécule :

1. Une activité de polymérase qui catalyse la croissance de la chaîne dans la direction 5'→3'

2. Une activité exonucléasique 3'→5' qui enlève les bases mal appariées

3. Une activité exonucléasique 5'→3' qui dégrade l'ADN à double brin

Par la suite, deux polymérases supplémentaires, pol II et pol III, furent identifiées chez *E. coli*. La polymérase pol II est capable de catalyser la réparation de l'ADN endommagé bien qu'aucune fonction particulière ne lui ait été assignée. Pol III est impliquée avec pol I dans la réplication de l'ADN d'*E. coli* (figure 11-21). Le complexe entier, ou **holoenzyme**, de pol III contient au moins 20 sous-unités polypeptidiques différentes, bien que le «noyau» catalytique de l'enzyme ne comporte que trois sous-unités, alpha (α), epsilon (ε) et thêta (θ). Le complexe pol III achève la réplication d'un ADN à un seul brin lorsqu'un court segment d'ADN duplex existe déjà. Le court oligonucléotide qui forme le duplex est appelé une **amorce** (primer).

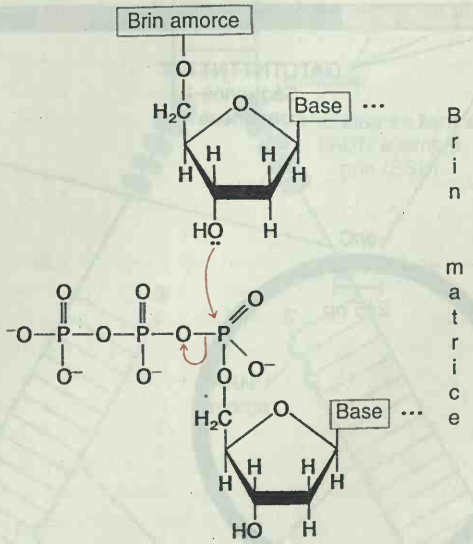


Figure 11-22. Réaction d'élongation de la chaîne d'ADN catalysée par l'ADN polymérase. (D'après L. Stryer, *Biochemistry*, 4ième éd. Copyright © 1995 par W. H. Freeman and Company.)

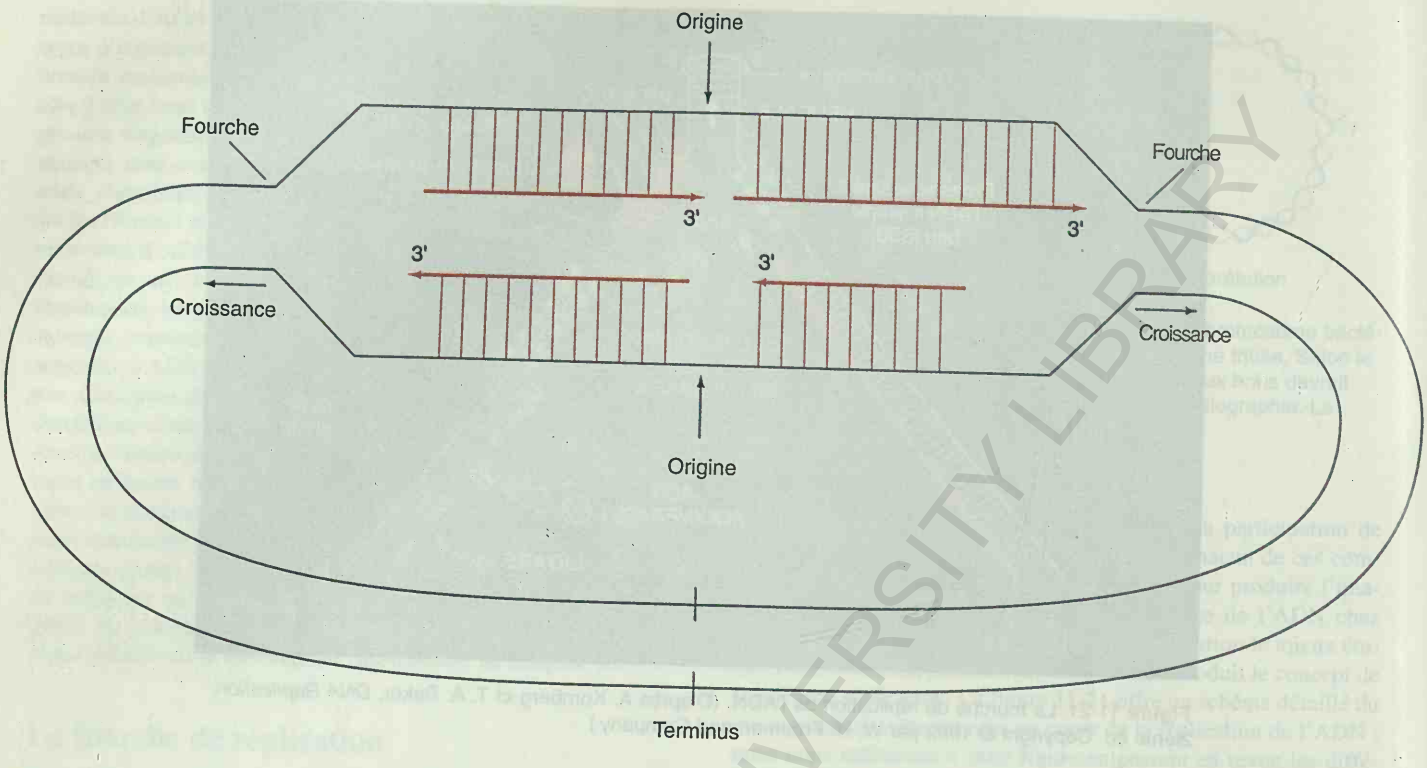


Figure 11-23. Représentation schématique de la réplication de l'ADN progressant dans les deux directions à partir de l'origine. (Modifié d'après A. Kornberg, *DNA Synthesis.* Copyright © 1974 par W. H. Freeman and Company).

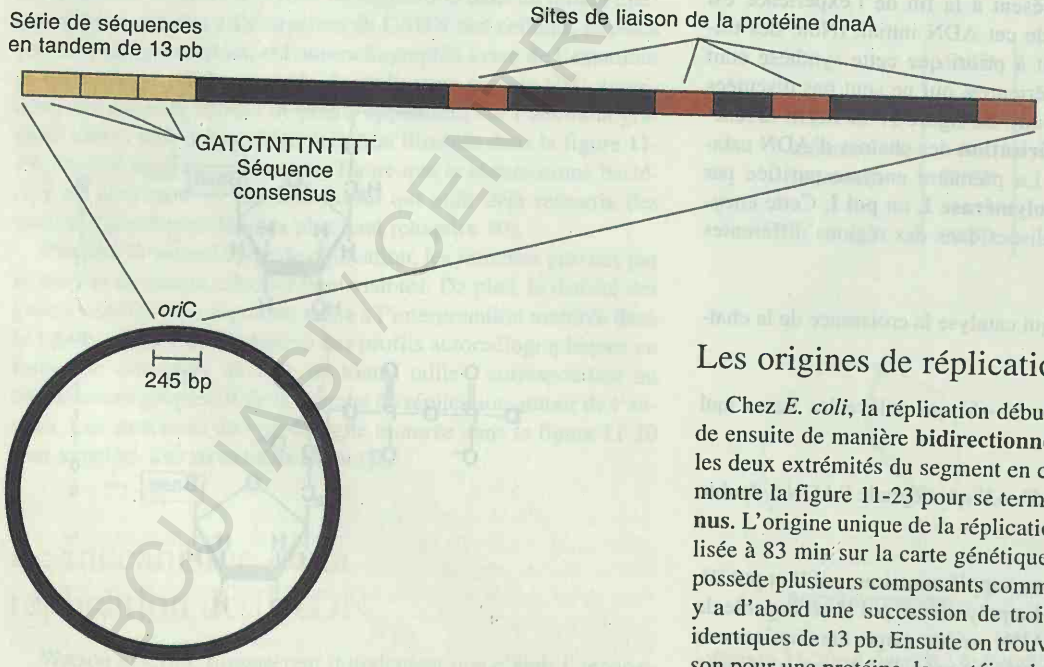


Figure 11-24. *OriC,* l'origine de réplication d'*E. coli,* est longue de 245 pb. Elle contient une série de trois séquences en tandem quasi identiques de treize nucléotides et quatre sites de liaison pour la protéine dnaA. Les orientations de ces sites sont indiquées par des flèches.

Les origines de réplication

Chez *E. coli*, la réplication débute à une **origine** fixe et procède ensuite de manière **bidirectionnelle** (les fourches migrant vers les deux extrémités du segment en cours de réplication) comme le montre la figure 11-23 pour se terminer à un site appelé le **terminus**. L'origine unique de la réplication est appelée *oriC* et est localisée à 83 min sur la carte génétique. Elle est longue de 245 pb et possède plusieurs composants comme le montre la figure 11-24. Il y a d'abord une succession de trois séquences en tandem quasi identiques de 13 pb. Ensuite on trouve un ensemble de sites de liaison pour une protéine, la protéine dnaA. L'étape initiale de la synthèse de l'ADN est le déroulement de l'ADN à l'endroit de l'origine en réponse à la fixation de la protéine dnaA. Les conséquences de la réplication bidirectionnelle sont montrées dans la figure 11-25 qui offre une vue plus large de la réplication de l'ADN.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

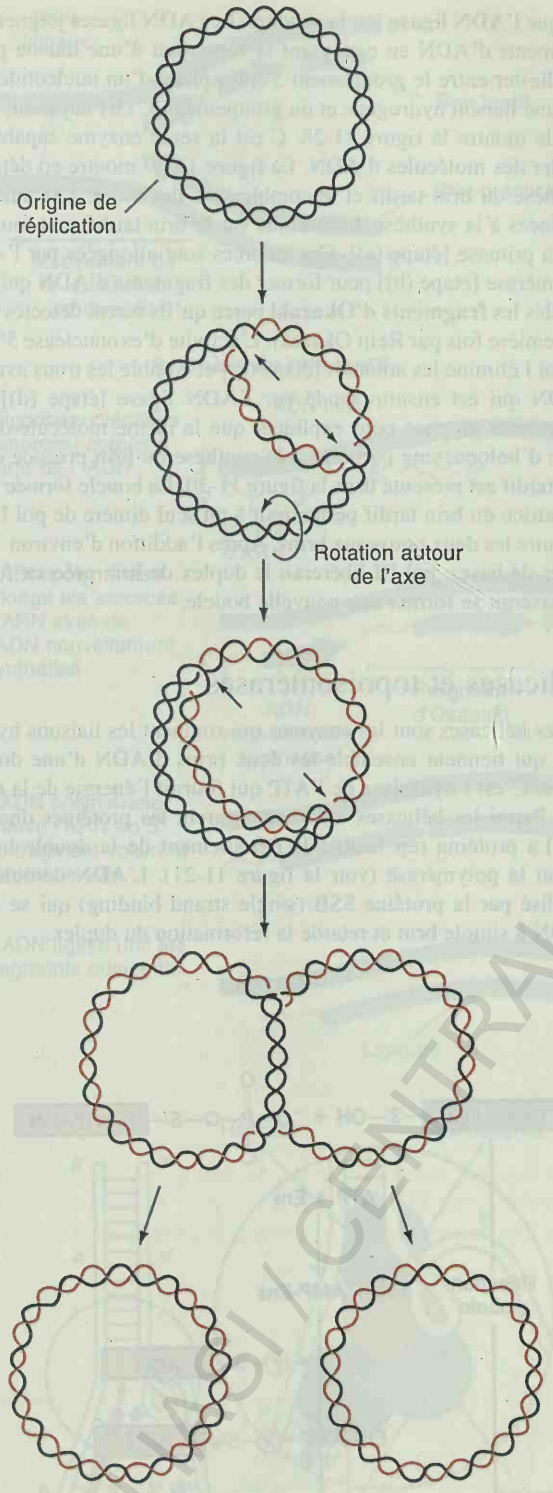


Figure 11-25. Réplication bidirectionnelle d'une molécule d'ADN circulaire.

L'amorçage de la synthèse de l'ADN

Les ADN polymérases peuvent allonger une chaîne existante mais sont incapables d'en commencer une. La synthèse de l'ADN, comme nous l'avons mentionné plus haut, doit donc être initiée avec une amorce, un court oligonucléotide qui forme un segment d'ADN à double brin. La participation d'une amorce dans la synthèse de l'ADN est montrée dans la figure 11-26 (voir aussi la figure 11-21). La réplication du chromosome d'*E. coli* fait intervenir des amorces d'ARN qui sont synthétisées soit par l'ARN polymérase, soit par une enzyme appelée la **primase**. La primase synthétise un court segment d'ARN (d'environ 30 pb) complémentaire d'une région spécifique du chromosome. La chaîne d'ARN est ensuite allongée par de l'ADN sous l'action de l'ADN polymérase. La primase d'*E. coli* forme un complexe avec la matrice d'ADN et des protéines supplémentaires comme dnaB, dnaT, priA, priB, et priC. L'ensemble de ce complexe est appelé un **primosome** (voir la figure 11-21).

Brin précoce et brin tardif

Les ADN polymérases ne synthétisent de nouvelles chaînes que dans la direction 5'→3' et, étant donné la nature antiparallèle de la molécule d'ADN, se déplacent donc dans la direction 3'→5' *le*

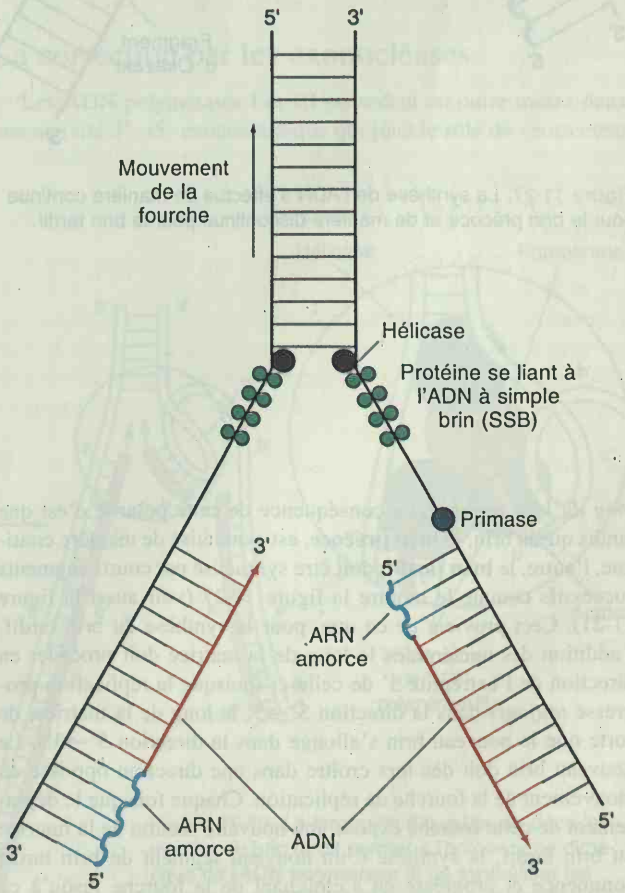


Figure 11-26. Initiation de la synthèse de l'ADN par une amorce d'ARN.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

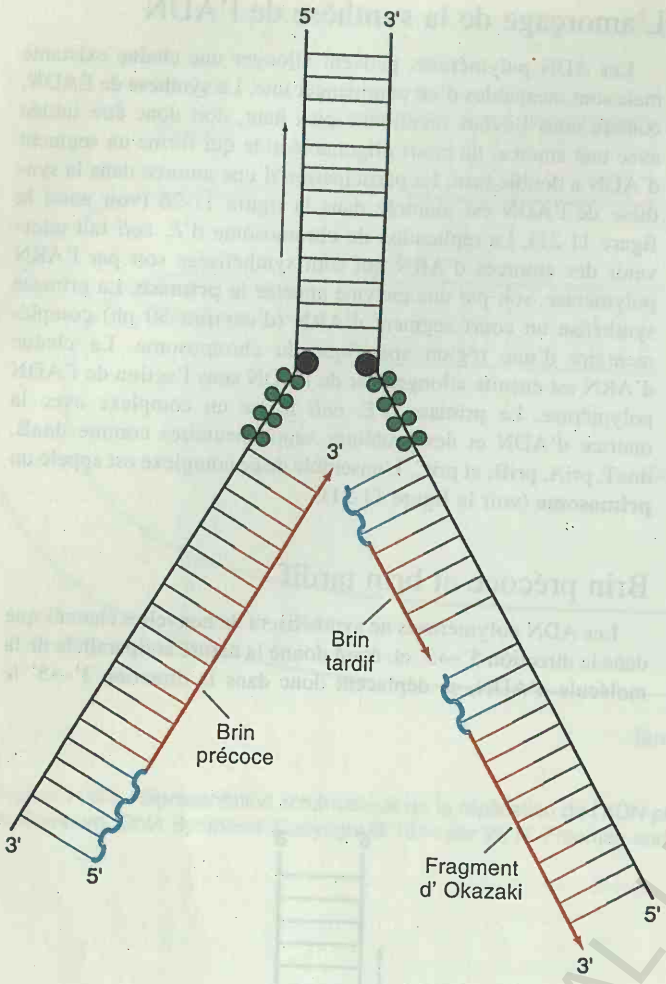


Figure 11-27. La synthèse de l'ADN s'effectue de manière continue pour le brin précoce et de manière discontinue pour le brin tardif.

long du brin matrice. La conséquence de cette polarité c'est que tandis qu'un brin, le **brin précoce**, est synthétisé de manière continue, l'autre, le **brin tardif,** doit être synthétisé par courts segments successifs comme le montre la figure 11-27 (voir aussi la figure 11-21). Ceci provient de ce que, pour la synthèse du brin tardif, l'addition des nucléotides le long de la matrice doit procéder en direction de l'extrémité 5' de celle-ci (puisque la réplication progresse *toujours* dans la direction 3'→5' le long de la matrice, de sorte que le nouveau brin s'allonge dans la direction 5'→3'). Le nouveau brin doit dès lors croître dans une direction opposée au mouvement de la fourche de réplication. Chaque fois que le déplacement de cette fourche expose une nouvelle section de la matrice du brin tardif, la synthèse d'un nouveau segment de brin tardif commence et progresse en s'éloignant de la fourche jusqu'à ce qu'elle soit arrêtée par le fragment précédent. Chez *E. coli,* pol III effectue l'essentiel de la synthèse de l'ADN sur les deux brins et pol I comble les vides qui subsistent ensuite dans le brin tardif tandis que l'**ADN ligase** fait la soudure. Les ADN ligases joignent les fragments d'ADN en catalysant la formation d'une liaison phosphodiester entre le groupement 5' phosphate d'un nucléotide fixé par une liaison hydrogène et un groupement 3' OH adjacent, ainsi que le montre la figure 11-28. C'est la seule enzyme capable de souder des molécules d'ADN. La figure 11-29 montre en détail la synthèse du brin tardif et le comblement des vides. Les amorces destinées à la synthèse discontinue sur le brin tardif sont fournies par la primase [étape (a)]. Ces amorces sont allongées par l'ADN polymérase [étape (b)] pour former des fragments d'ADN qui sont appelés les **fragments d'Okazaki** parce qu'ils furent détectés pour la première fois par Reiji Okazaki. L'activité d'exonucléase 5'→3' de pol I élimine les amorces [étape (c)] et comble les trous avec de l'ADN qui est ensuite soudé par l'ADN ligase [étape (d)]. Un mécanisme proposé pour expliquer que la même molécule dimérique d'holoenzyme participe à la synthèse du brin précoce et du brin tardif est présenté dans la figure 11-30. La boucle formée dans la matrice du brin tardif permettrait à un seul dimère de pol III de produire les deux nouveaux brins. Après l'addition d'environ 1000 paires de bases, pol III libérerait le duplex de brin précoce formé et laisserait se former une nouvelle boucle.

Hélicases et topoisomérases

Les hélicases sont les enzymes qui rompent les liaisons hydrogène qui tiennent ensemble les deux brins d'ADN d'une double hélice. C'est l'hydrolyse de l'ATP qui fournit l'énergie de la réaction. Parmi les hélicases d'*E. coli* figurent les protéines dnaB et rep. La protéine rep facilite le déroulement de la double hélice devant la polymérase (voir la figure 11-21). L'ADN déroulé est stabilisé par la protéine SSB (single strand binding) qui se lie à l'ADN à simple brin et retarde la reformation du duplex.

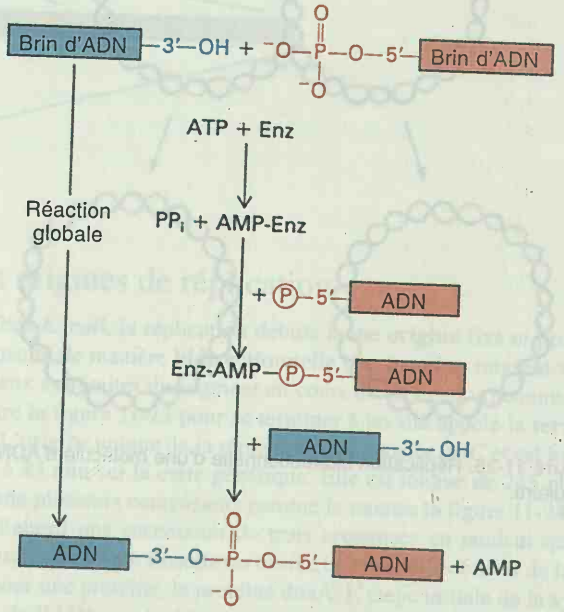


Figure 11-28. La réaction catalysée par l'ADN ligase (Enz) unit l'extrémité 3'OH d'un fragment au phosphate 5' du fragment adjacent (D'après H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright © 1995 par Scientific American Books, Inc.)

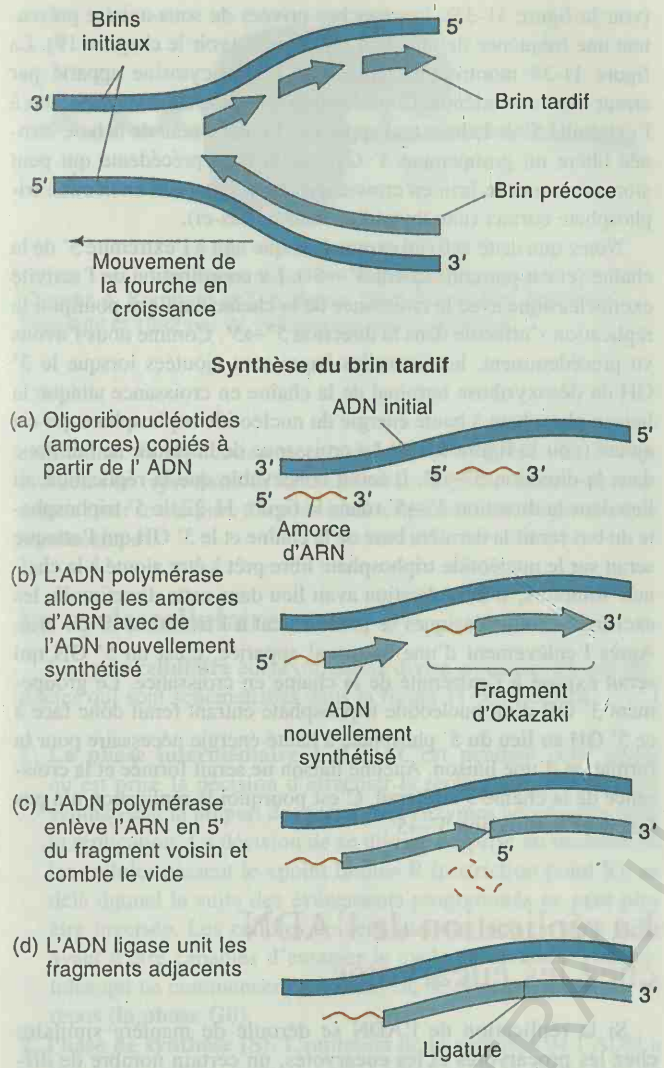


Figure 11-29. La structure globale d'une fourche en croissance (en haut) et les étapes de la synthèse du brin tardif (D'après H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology,* 3ième éd. Copyright © 1995 par Scientific American Books, Inc.)

L'action des hélicases au cours de la réplication crée dans l'ADN circulaire des tors qui doivent être éliminés pour permettre à la réplication de se poursuivre. Nous devons être conscients que l'ADN peut être torsadé et enroulé, un peu comme des enroulements supplémentaires peuvent être créés dans un élastique. Ce **surenroulement** peut être provoqué ou éliminé par des enzymes appelées **topoisomérases**, dont un exemple est l'ADN gyrase (figure 11-31). Les topoisomérases sont également capables de faire ou de défaire des nœuds (*caténation* ou *décaténation)* ou des liaisons dans une chaîne d'ADN. Il y a deux types d'isomérases. Celles du type I coupent un des brins d'un ADN duplex. Les enzymes du type II effectuent une coupure dans les deux brins. Chez *E. coli*, les topo I et topo III sont des exemples d'enzymes de type I et la gyrase un exemple d'enzyme de type II.

Le déroulement des brins d'ADN en vue d'ouvrir la fourche de réplication provoque un enroulement supplémentaire dans d'autres régions et le surenroulement supprime la tension due à cet enroulement supplémentaire (voir la figure 11-32). Au cours de la réplication, la gyrase est nécessaire pour éliminer le surenroulement supplémentaire en avant de la fourche de réplication.

La correction par les exonucléases

Les ADN polymérases I et III possèdent en outre toutes deux une activité 3'→5' exonucléasique qui joue le rôle de «correcteur

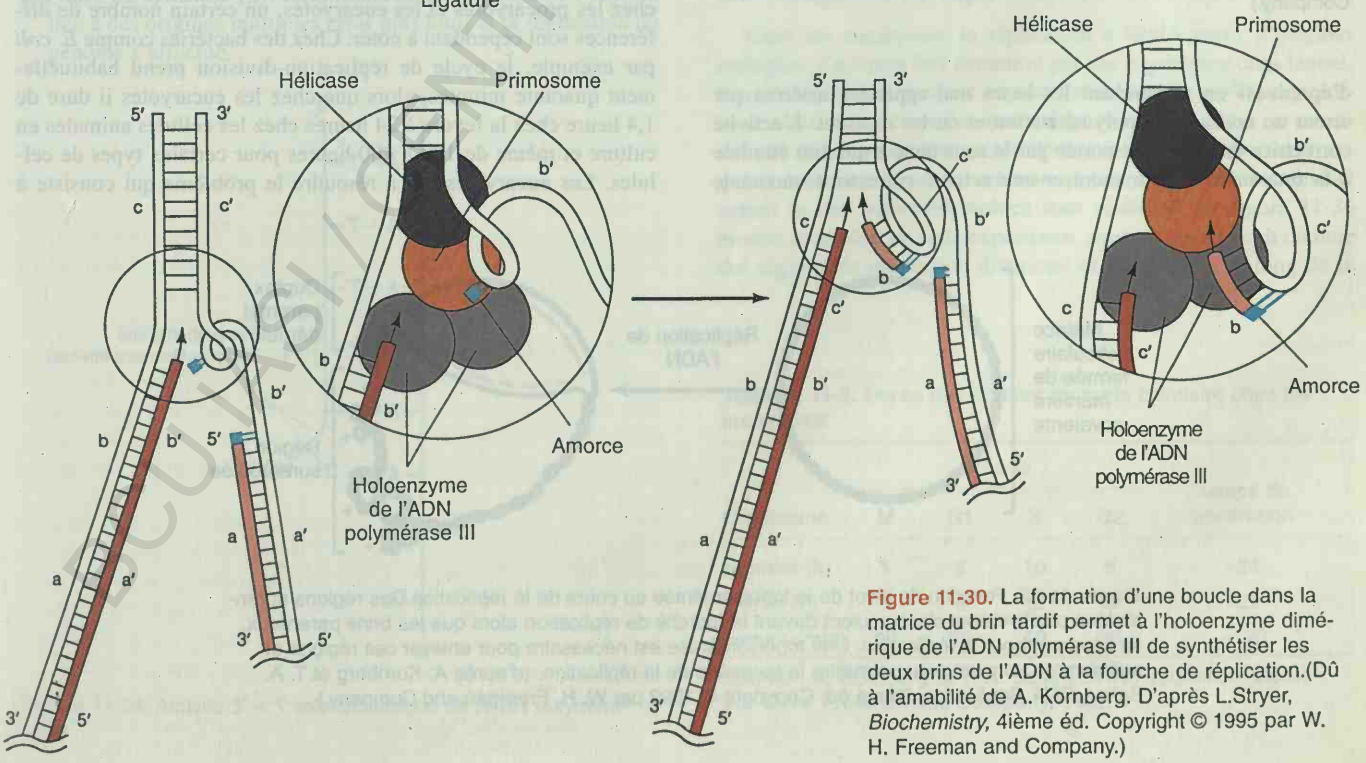


Figure 11-30. La formation d'une boucle dans la matrice du brin tardif permet à l'holoenzyme dimérique de l'ADN polymérase III de synthétiser les deux brins de l'ADN à la fourche de réplication.(Dû à l'amabilité de A. Kornberg. D'après L.Stryer, *Biochemistry,* 4ième éd. Copyright © 1995 par W. H. Freeman and Company.)

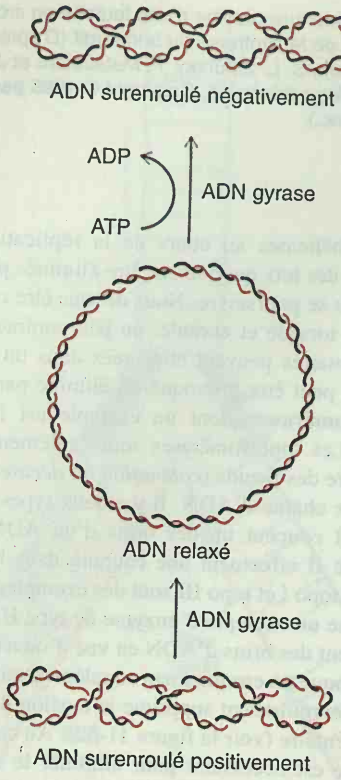


Figure 11-31. Le surenroulement catalysé par l'ADN gyrase. L'ADN engagé dans la réplication subit des surenroulements «positifs» (décrits au bas du schéma) par suite de la rotation rapide de l'ADN à la fourche de réplication. L'ADN gyrase peut rompre ou fermer des liaisons phosphodiester, et donc éliminer le surenroulement comme on le voit ici (ADN relaxé). La gyrase peut aussi introduire des enroulements en direction inverse, appelés «négatifs» ; cette disposition facilite le déroulement de l'hélice. (Modifié d'après L. Stryer, *Biochemistry*, 4ième éd. Copyright © 1995 par W. H. Freeman and Company.)

d'épreuves» en recherchant les bases mal appariées insérées par erreur au cours de la polymérisation et en les excisant. L'activité correctrice de pol III est portée par la sous-unité ε qui doit être liée à la sous-unité α pour montrer une activité correctrice maximale (voir la figure 11-33). Les souches privées de sous-unité ε présentent une fréquence de mutation plus élevée (voir le chapitre 19). La figure 11-34 montre l'excision d'un résidu cytosine apparié par erreur avec une adénine Comme vous le voyez, l'hydrolyse a lieu à l'extrémité 5' de la base mal appariée ; l'enlèvement de la base erronée libère un groupement 3' OH sur la base précédente qui peut alors continuer le brin en croissance en acceptant le nucléotide triphosphate correct (une thymidine dans ce cas-ci).

Notez que cette activité exonucléasique agit à l'extrémité 3' de la chaîne (et est par conséquent 3'→5'). La coordination de l'activité exonucléasique avec la croissance de la chaîne explique pourquoi la réplication s'effectue dans la direction 5'→3'. Comme nous l'avons vu précédemment, les nouvelles bases sont ajoutées lorsque le 3' OH du désoxyribose terminal de la chaîne en croissance attaque la liaison phosphate à haute énergie du nucléotide triphosphate qui est ajouté (voir la figure 11-22).La croissance de la chaîne se fait donc dans la direction 5'→3'. Il serait concevable que la réplication ait lieu dans la direction 3'→5' (dans la figure 11-22, le 5' triphosphate du bas serait la dernière base de la chaîne et le 3' OH qui l'attaque serait sur le nucléotide triphosphate libre prêt à être ajouté à la chaîne). Toutefois, si la réplication avait lieu dans cette direction-là, les excisions exonucléasiques se produiraient à l'extrémité 5' du brin. Après l'enlèvement d'une base mal appariée, c'est un 5' OH qui serait exposé à l'extrémité de la chaîne en croissance. Le groupement 3' OH d'un nucléotide triphosphate entrant ferait donc face à ce 5' OH au lieu du 5' phosphate à haute énergie nécessaire pour la formation d'une liaison. Aucune liaison ne serait formée et la croissance de la chaîne s'arrêterait. C'est pourquoi la réplication n'a pas lieu dans la direction 3'→5'.

La réplication de l'ADN chez les eucaryotes

Si la réplication de l'ADN se déroule de manière similaire chez les procaryotes et les eucaryotes, un certain nombre de différences sont cependant à noter. Chez des bactéries comme *E. coli* par exemple, le cycle de réplication-division prend habituellement quarante minutes, alors que chez les eucaryotes il dure de 1,4 heure chez la levure à 24 heures chez les cellules animales en culture et même de 100 à 200 heures pour certains types de cellules. Les eucaryotes ont à résoudre le problème qui consiste à

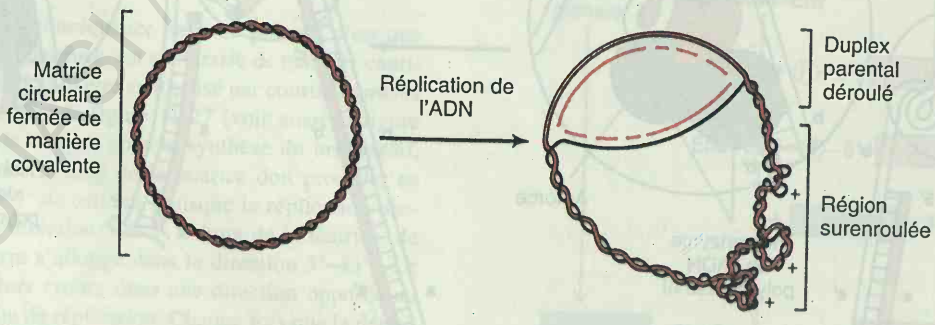


Figure 11-32. Fonction de pivot de la topoisomérase au cours de la réplication.Des régions surenroulées positivement s'accumulent devant la fourche de réplication alors que les brins parentaux se séparent pour la réplication. Une topoisomérase est nécessaire pour enlever ces régions et agit comme un pivot pour permettre la poursuite de la réplication. (d'après A. Kornberg et T. A. Baker, *DNA Replication*, 2ième éd. Copyright © 1992 par W. H. Freeman and Company.)

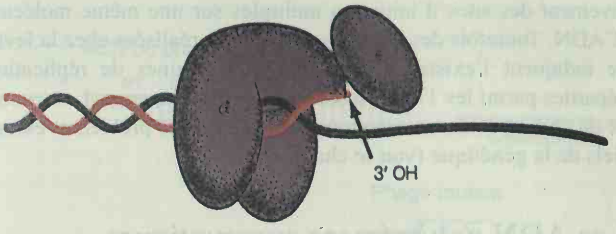


Figure 11-33. Correction d'épreuve par le complexe pol III α-ε (D'après A. Kornberg et T. A. Baker, *DNA Replication*, 2ième éd. Copyright © 1992 par W. H.Freeman and Company.)

coordonner la réplication de plusieurs chromosomes aussi bien que celui de reproduire la structure très complexe de ces chromosomes (voir le chapitre 16 pour la description de la structure de ce chromosome).

Le cycle cellulaire

Le **cycle cellulaire** eucaryotique se divise en quatre phases distinctes qui sont schématisées dans la figure 11-35. Ce sont :

1. **La phase intermédiaire 1 (G1).** C'est pendant cette phase qu'est prise la décision d'effectuer la réplication. Les cellules synthétisent la plupart des facteurs et enzymes nécessaires pour la réplication. La décision de se diviser est prise au moment où les cellules passent le «point limite» R (restriction point R), au delà duquel la suite des événements programmés ne peut plus être inversée. Les cellules doivent atteindre une certaine taille avant d'être capables d'entamer le cycle de division. Les cellules qui ne commencent pas un cycle de division sont dites au repos (**la phase G0**).
2. **Phase de synthèse (S).** L'initiation de la synthèse de l'ADN a lieu à des origines multiples (voir plus loin) et la réplication du génome s'effectue.

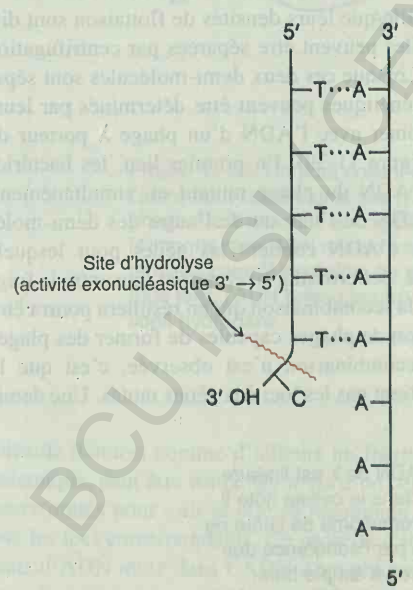


Figure 11-34. Activité 3'→ 5' exonucléasique de l'ADN polymérase III.

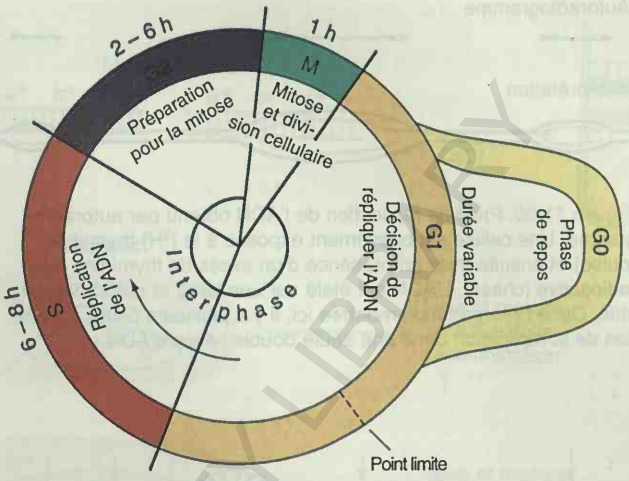


Figure 11-35. Cycle de croissance d'une cellule eucaryotique, y compris une phase de repos G0. Les variations de la durée du cycle cellulaire sont dues essentiellement aux variations de la durée de la phase G1. (Modifié d'après A. Kornberg et T. A. Baker, *DNA Replication*, 2ième éd. Copyright © 1992 by W. H. Freeman and Company.)

3. **Phase intermédiaire 2 (G2).** La cellule se prépare pour la mitose. Les chromosomes se condensent et des facteurs cytoplasmiques importants pour celle-ci sont synthétisés
4. **Phase mitotique (M).** Les chromosomes se séparent et des cellules filles se forment.

Le tableau 11-2 compare les longueurs des phases du cycle cellulaire chez plusieurs eucaryotes.

Les origines de réplication

Chez les eucaryotes, la réplication a lieu à partir d'origines multiples. Ceci peut être démontré par une expérience dans laquelle une cellule eucaryote est exposée brièvement à la [^{3}H]-thymidine au cours d'une étape de «**marquage court**» (pulse) et est ensuite mise en présence d'un excès de thymidine «froide» (non marquée) dans une étape de «**chasse**» (chase) ; l'ADN est ensuite extrait et des autoradiographies sont réalisées. La figure 11-36 montre le résultat de cette expérience, avec ce qui apparaît comme des régions de réplication distinctes et simultanées le long de la

Tableau 11-2. Durée des phases du cycle cellulaire chez les eucaryotes

Organisme	Phase M	Phase G1	Phase S	Phase G2	Temps de génération
Homme (h)	1	8	10	5	~24
Plante (h)	1	8	12	8	~29
Levure (min)	20	25	40	35	~120

Source : A. Kornberg et T. A. Baker, *DNA Replication*, 2ième éd. W. H. Freeman and Company, 1992.

BCU LAUSANNE CENTRALE UNIVERSITY LIBRARY

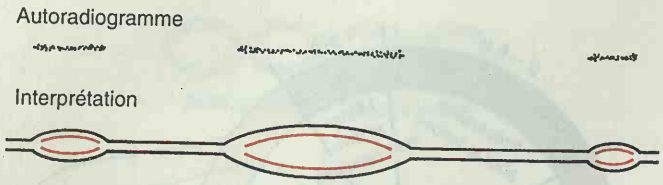


Figure 11-36. Profil de réplication de l'ADN obtenu par autoradiographie. Une cellule est brièvement exposée à la [^{3}H]-thymidine (pulse) et ensuite mise en présence d'un excès de thymidine non radioactive (chase). L'ADN est étalé sur une lame et autoradiographié. Dans l'interprétation montrée ici, il y a plusieurs points d'initiation de la réplication dans une seule double hélice d'ADN.

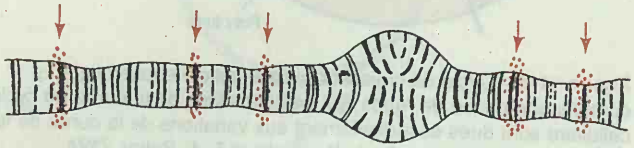


Figure 11-37. Profil de réplication d'un chromosome polytène de *Drosophila* révélé par autoradiographie. Plusieurs points de réplications sont visibles sur un chromosome ainsi que l'indiquent les flèches.

molécule d'ADN. La réplication semble donc commencer à plusieurs endroits de ces chromosomes eucaryotiques. De manière analogue, une étude par «marquage court et chasse» de la réplication de l'ADN dans les chromosomes polyténiques (géants) de la drosophile révèle la présence de multiples régions de réplication sur chacun des bras des chromosomes (figure 11-37). Jusqu'à présent, il n'existe pas de preuve certaine que ces régions sont effectivement des sites d'initiation multiples sur une même molécule d'ADN. Toutefois des expériences récentes réalisées chez la levure indiquent l'existence d'environ 400 origines de réplication réparties parmi les 17 chromosomes de cet organisme. La structure du chromosome eucaryotique demeure un des problèmes essentiels de la génétique (voir le chapitre 16).

Les ADN polymérases eucaryotiques

Il y a au moins quatre ADN polymérases, α, β, γ et δ, chez les eucaryotes supérieurs. Les polymérases α et δ, dans le noyau, ont des rôles similaires à ceux de pol II chez *E. coli*. La polymérase β participe à la réparation de l'ADN et au comblement des vides. La polymérase γ se trouve dans les mitochondries et semble impliquée dans la réplication de l'ADN mitochondrial.

L'ADN et le gène

Nous savons maintenant que l'ADN est le matériel génétique et qu'il consiste en une séquence linéaire de paires de nucléotides. La conclusion évidente de ces observations est que les cartes factorielles constituent l'équivalent génétique de la séquence des paires de nucléotides de l'ADN. Pour vérifier cette hypothèse il s'agit de montrer que *les cartes génétiques et les cartes de l'ADN sont congruentes*. Cette question fut d'abord envisagée dans d'élégantes manipulations génétiques et biochimiques.

L'ADN du phage λ est un segment linéaire qui peut être circularisé car il se termine par des extrémités 5' monocaténaires complémentaires longues de 12 bases (figure 11-38). En raison de cette complémentarité, ces extrémités peuvent s'associer pour former une molécule d'ADN circulaire ; elles sont appelées *bouts collants* ou *extrémités cohésives* (sticky ends).

Lorsqu'un objet linéaire comme la molécule d'ADN est soumis à une force de cisaillement (par exemple, dans une pipette ou dans un agitateur), l'effort mécanique provoque des cassures surtout au milieu de la molécule. Lorsque l'ADN du phage λ est cassé en deux, il se fait que les deux moitiés ont des rapports de G–C : A–T différents, ce qui signifie que leurs densités de flottaison sont différentes et donc qu'elles peuvent être séparées par centrifugation en gradient de CsCl. Lorsque ces deux demi-molécules sont séparées, leurs contenus génétiques peuvent être déterminés par leurs aptitudes à se recombiner avec l'ADN d'un phage λ porteur de mutations connues (figure 11-39). En premier lieu, les bactéries sont infectées avec l'ADN du phage mutant et, simultanément, transformées avec l'ADN de l'une ou de l'autre des demi-molécules. Si le fragment d'ADN contient les gènes pour lesquels l'ADN injecté est muté, des crossing-over auront lieu entre le fragment et l'ADN muté ; la recombinaison qui en résultera pourra être détectée par l'apparition de phages capables de former des plages de lyse. Si aucune recombinaison n'est observée, c'est que la demi-molécule ne contient pas les loci des gènes mutés. Une demi-

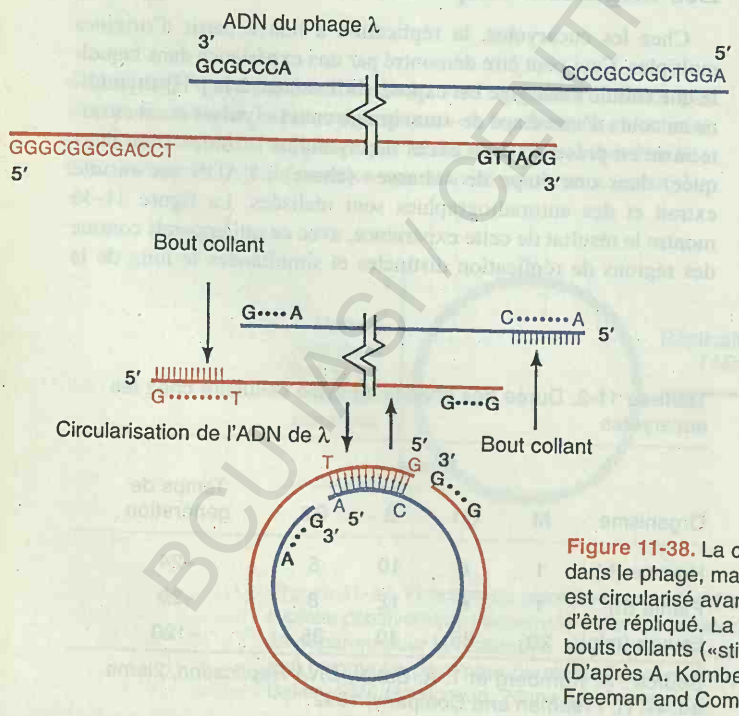


Figure 11-38. La circularisation de l'ADN. L'ADN de λ est linéaire dans le phage, mais une fois qu'il se trouve dans la cellule hôte il est circularisé avant d'être inséré dans le chromosome de l'hôte ou d'être répliqué. La circularisation est réalisée par l'adhérence des bouts collants («sticky» ends) complémentaires à simple brin. (D'après A. Kornberg, *DNA Synthesis*. Copyright © 1974 par W.H. Freeman and Company.)

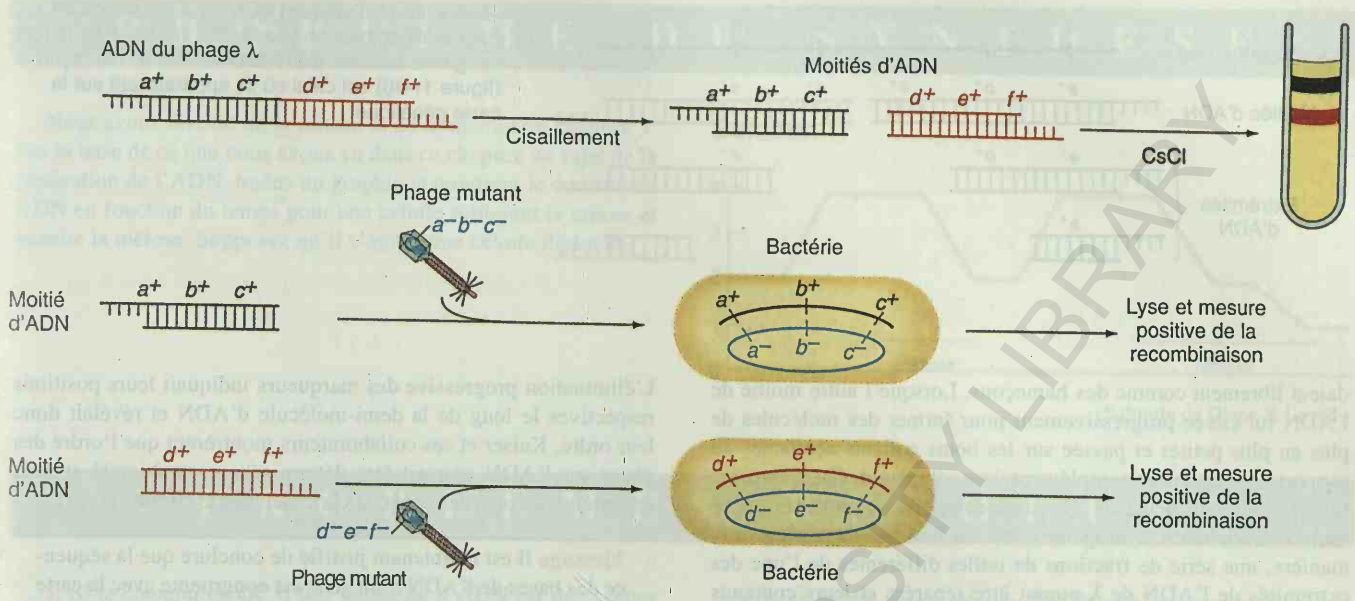


Figure 11-39. Lorsque l'ADN de λ est scindé en deux, il forme des moitiés approximativement égales qui diffèrent par leurs densités. Chaque moitié peut être «sauvée» par un phage portant des mutations multiples au cours d'une opération de transformation et d'infection simultanées. De ces expériences, on déduit que seuls les gènes d'une moitié déterminée de la carte génétique peuvent être sauvés au moyen d'une moitié donnée de l'ADN. (Il faut noter que le chromosome bactérien a été omis ici pour simplifier le schéma.)

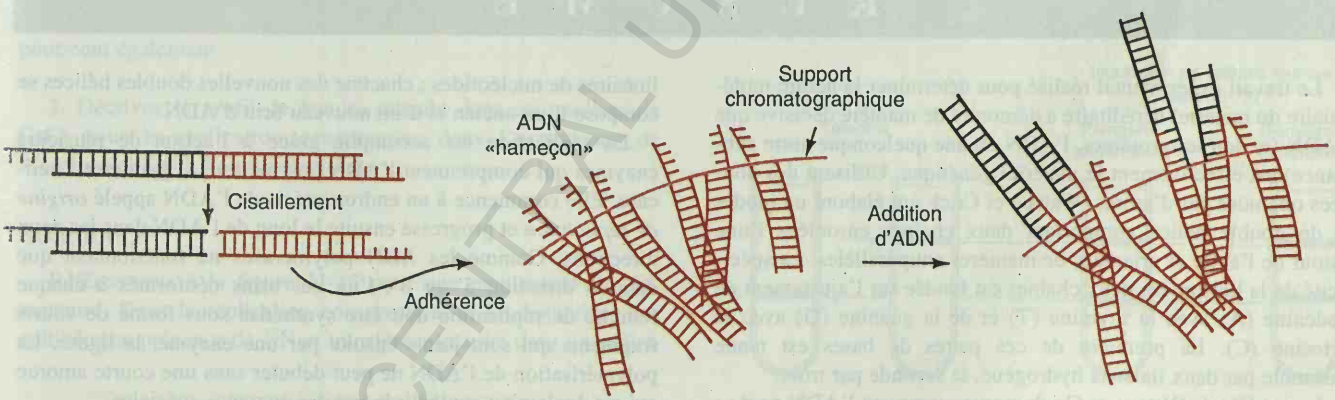


Figure 11-40. Un bout collant de la molécule d'ADN peut être utilisé comme un «hameçon» pour «pêcher» l'autre bout collant ainsi que n'importe quel gène qui s'y trouverait attaché. Une des moitiés de l'ADN du phage λ est attachée au support chromatographique de telle sorte que les bouts collants soient exposés. N'importe quel ADN mis en contact avec ce support chromatographique et possédant des séquences monocaténaires complémentaires de celle des bouts collants «hameçon» sera retenu. Tout autre ADN ne le sera pas. Plus tard, l'ADN retenu pourra être enlevé du support chromatographique par chauffage pour rompre les liaisons hydrogène.

molécule donnée, comme d'ailleurs un fragment d'ADN de taille quelconque, peut être testée vis-à-vis d'un certain nombre de marqueurs mutés pour voir si elle se recombine avec eux et contient donc les loci correspondants. Ce procédé d'incorporation de fragments d'ADN muté dans l'ADN d'un phage normal et le «sauvetage» des gènes concernés lors de la lyse est appelé une expérience de **sauvetage de marqueurs** (marker rescue experiment). *De telles expériences établissent qu'une moitié déterminée de la molécule d'ADN porte l'information d'une moitié déterminée de la carte génétique.*

D'autres expériences ont démontré que l'ordre des gènes sur une section d'ADN correspond avec leur ordre sur les cartes génétiques. Dale Kaiser et ses collaborateurs séparèrent une des demi-molécules d'ADN porteuses d'un bout collant et attachèrent l'autre à un support chromatographique sur lequel on peut faire passer l'ADN (figure 11-40). Les extrémités à simple brin y pen-

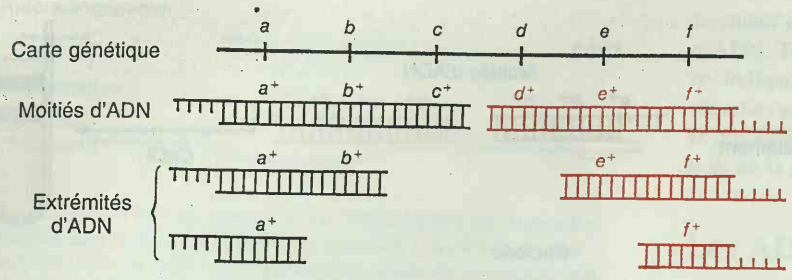


Figure 11-41. Lorsque l'ADN de λ est scindé en fragments de plus en plus petits, l'ordre dans lequel les gènes cessent d'être accessibles à l'hameçon (figure 11-40) est celui où ils apparaissent sur la carte génétique.

daient librement comme des hameçons. Lorsque l'autre moitié de l'ADN fut clivée progressivement pour former des molécules de plus en plus petites et passée sur les bouts collants accrochés au support, les séquences complémentaires adhérèrent. Ces fragments furent aisément détachés en augmentant la température pour rompre les liaisons hydrogène entre les bouts collants. De cette manière, une série de fractions de tailles différentes de l'une des extrémités de l'ADN de λ purent être séparées et leurs contenus génétiques déterminés par «sauvetage de marqueurs». L'élimination progressive des marqueurs indiquait leurs positions respectives le long de la demi-molécule d'ADN et révélait donc leur ordre. Kaiser et ses collaborateurs montrèrent que l'ordre des gènes sur l'ADN pouvait être déterminé sans ambiguïté et était parfaitement congruent avec la carte génétique (figure 11-41).

Message Il est maintenant justifié de conclure que la séquence des bases de l'ADN d'un gène est congruente avec la carte de ce gène.

RÉSUMÉ

Le travail expérimental réalisé pour déterminer la nature moléculaire du matériel héréditaire a démontré de manière décisive que l'ADN (et non les protéines, l'ARN ou une quelconque autre substance) est effectivement le matériel génétique. Utilisant des données obtenues par d'autres, Watson et Crick ont élaboré un modèle de double hélice comportant deux chaînes enroulées l'une autour de l'autre et orientées de manières antiparallèles. La spécificité de la liaison des deux chaînes est fondée sur l'ajustement de l'adénine (A) avec la thymine (T) et de la guanine (G) avec la cytosine (C). La première de ces paires de bases est tenue ensemble par deux liaisons hydrogène, la seconde par trois.

Le modèle de Watson et Crick montre comment l'ADN peut se répliquer de manière ordonnée — une nécessité capitale pour le matériel génétique. La réplication est effectuée de manière semi-conservative chez les procaryotes aussi bien que chez les eucaryotes. Une double hélice est répliquée en formant deux doubles hélices identiques, possédant exactement les mêmes séquences linéaires de nucléotides ; chacune des nouvelles doubles hélices se compose d'un ancien et d'un nouveau brin d'ADN.

La réplication est accomplie grâce à l'action de plusieurs enzymes qui comprennent l'ADN polymérase, la gyrase et l'hélicase. Elle commence à un endroit précis de l'ADN appelé *origine de réplication* et progresse ensuite le long de l'ADN dans les deux directions. Comme les ADN polymérases ne fonctionnent que dans la direction 5' → 3', l'un des brins néoformés à chaque fourche de réplication doit être synthétisé sous forme de courts fragments qui sont joints ensuite par une enzyme, la ligase. La polymérisation de l'ADN ne peut débuter sans une courte amorce qui est également synthétisée par des enzymes spéciales.

La technique de sauvetage de marqueurs a permis de démontrer que la séquence des gènes sur le chromosome correspond exactement à la séquence linéaire de l'ADN et a établi de manière convaincante que les entités génétiques et chimiques sont une seule et même chose.

Diagramme conceptuel

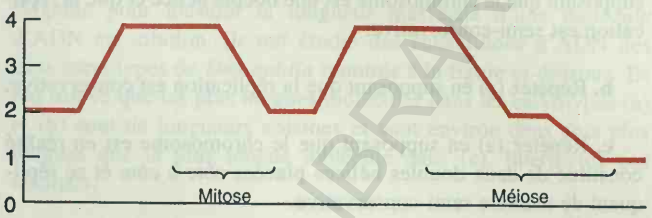
Dressez un diagramme conceptuel liant autant des termes suivants que possible. Notez qu'il ne sont pas présentés dans un ordre particulier.

Double hélice d'ADN / nucléotides / liaison hydrogène / semi-conservatif / 5' / réplication / chromatide / mitose / ADN polymérase / méiose / phase S / gène / 3'

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Nous avons discuté de la mitose et de la méiose au chapitre 3. Sur la base de ce que nous avons vu dans ce chapitre au sujet de la réplication de l'ADN, tracez un graphique montrant le contenu en ADN en fonction du temps pour une cellule subissant la mitose et ensuite la méiose. Supposez qu'il s'agit d'une cellule diploïde.

Solution



(Solution de Diane K Lavett.)

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Si le contenu en GC d'une molécule d'ADN est de 56 pour cent, quels sont les pourcentages des quatre bases (A, T, G et C) de cette molécule ?

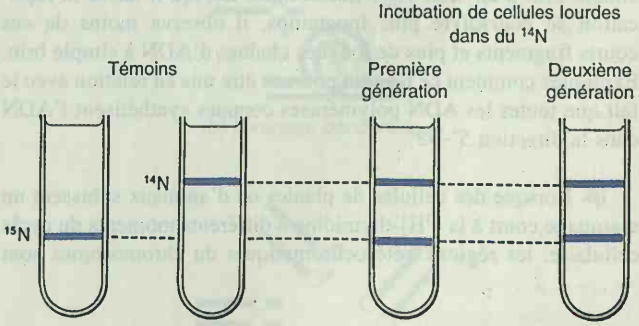
Solution

Si le contenu de GC d'une molécule est de 56 pour cent, puisque G = C, le contenu de G est de 28 pour cent comme celui de C. Le contenu d'AT est de 100 – 56 = 44 pour cent. Comme A = T, le contenu de A est de 22 pour cent et celui de T est de 22 pour cent également.

2. Décrivez le profil de bandes attendu dans un gradient de CsCl pour la réplication *conservative* dans l'expérience de Meselson et Stahl. Faites un schéma.

Solution

Référez-vous à la figure 11-15 pour une explication supplémentaire. Dans la réplication conservative, si les bactéries sont cultivées en présence de ^{15}N et transférées ensuite dans un milieu contenant du ^{14}N, une molécule d'ADN sera entièrement marquée au ^{15}N après la première génération tandis que l'autre molécule ne contiendra que du ^{14}N. Ceci se traduira par une bande lourde et une bande légère dans le gradient. Après la deuxième génération, l'ADN ^{15}N fournira une molécule ne contenant que du ^{15}N et une molécule ne contenant que du ^{14}N, tandis que l'ADN ^{14}N fournira seulement de l'ADN ^{14}N. Ainsi, seuls des ADN contenant uniquement du ^{14}N ou uniquement du ^{15}N seront observés au cours de l'expérience, produisant une bande légère et une bande lourde (voir figure ci-dessous).



PROBLÈMES

1. Décrivez les différents types de liaisons chimiques et les forces impliquées dans la double hélice.

2. Expliquez ce que l'on entend par les termes de *réplication conservative* et *réplication semi-conservative.*

3. Qu'entend-on par une *amorce* (primer) et pourquoi les amorces sont-elles nécessaires pour la réplication de l'ADN ?

4. Que sont les hélicases et les topoisomérases ?

5. Pourquoi la synthèse de l'ADN est-elle continue sur un brin et discontinue sur le brin opposé ?

6. Si la thymine représente 15 pour cent des bases dans une molécule d'ADN déterminée, quel sera le pourcentage de cytosine ?

7. Si le contenu en GC d'une molécule d'ADN est de 48 pour cent, quels sont les pourcentages des quatre bases (A, T, G et C) de cette molécule ?

8. On laisse des chromosomes d'*E. coli* dont tous les atomes d'azote sont marqués (c'est-à-dire dont chaque atome d'azote est de l'isotope lourd ^{15}N au lieu de l'isotope normal ^{14}N) se répliquer dans un environnement où tout l'azote est du ^{14}N. En utilisant une ligne continue pour représenter une chaîne polynucléotidique lour-

BCU/ST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de et un pointillé pour représenter une chaîne légère, faites des croquis de ce qui suit :

a. Le chromosome parental lourd et les produits de la première réplication après le transfert dans un milieu contenant du ^{14}N, en supposant que le chromosome est une double hélice et que la réplication est semi-conservative.

b. Répétez (a) en supposant que la réplication est conservative.

c. Répétez (a) en supposant que le chromosome est en réalité constitué de deux doubles hélices placées côte à côte et se répliquant de manière semi-conservative.

d. Répétez (c) en supposant que chacune des doubles hélices situées côte à côte se réplique de manière conservative et que la réplication globale du *chromosome* est semi-conservative.

e. Répétez (d) en supposant que la réplication globale du chromosome est conservative.

f. Si les chromosomes fils de la première division en présence de ^{14}N sont centrifugés dans un gradient de densité de chlorure de césium (CsCl) et si une bande unique est obtenue, lesquelles des possibilités (a) à (e) peuvent-elles être écartées ? Réexaminer l'expérience de Meselson et Stahl : que *prouve*-t-elle ?

9. En extrayant l'ADN néo-synthétisé et en le dénaturant par fusion, R. Okasaki constata que les produits directs de la réplication de l'ADN chez *E. coli* comprennent des fragments d'ADN à simple brin d'environ 1000 nucléotides. Lorsqu'il laissa la réplication se poursuivre plus longtemps, il observa moins de ces courts fragments et plus de longues chaînes d'ADN à simple brin. Expliquez comment ce résultat pourrait être mis en relation avec le fait que toutes les ADN polymérases connues synthétisent l'ADN dans la direction 5'→3'.

10. Lorsque des cellules de plantes ou d'animaux subissent un marquage court à la [^3H]-thymidine à différents moments du cycle cellulaire, les régions hétérochromatiques du chromosomes sont invariablement « répliquées tardivement ». Pouvez-vous suggérer une signification biologique, s'il en existe une, pour cette observation ?

11. Sur la planète Rama, l'ADN comporte six nucléotides : A, B, C, D, E et F. A et B sont appelés des *marzines*, C et D des *orsines*, et E et F des *pirines*. Les règles suivantes sont valables pour tous les ADN de Rama :

Total des marzines = total des orsines = total des pirines

$$A = C = E$$

$$B = D = F$$

a. Préparez un modèle de structure de l'ADN de Rama.

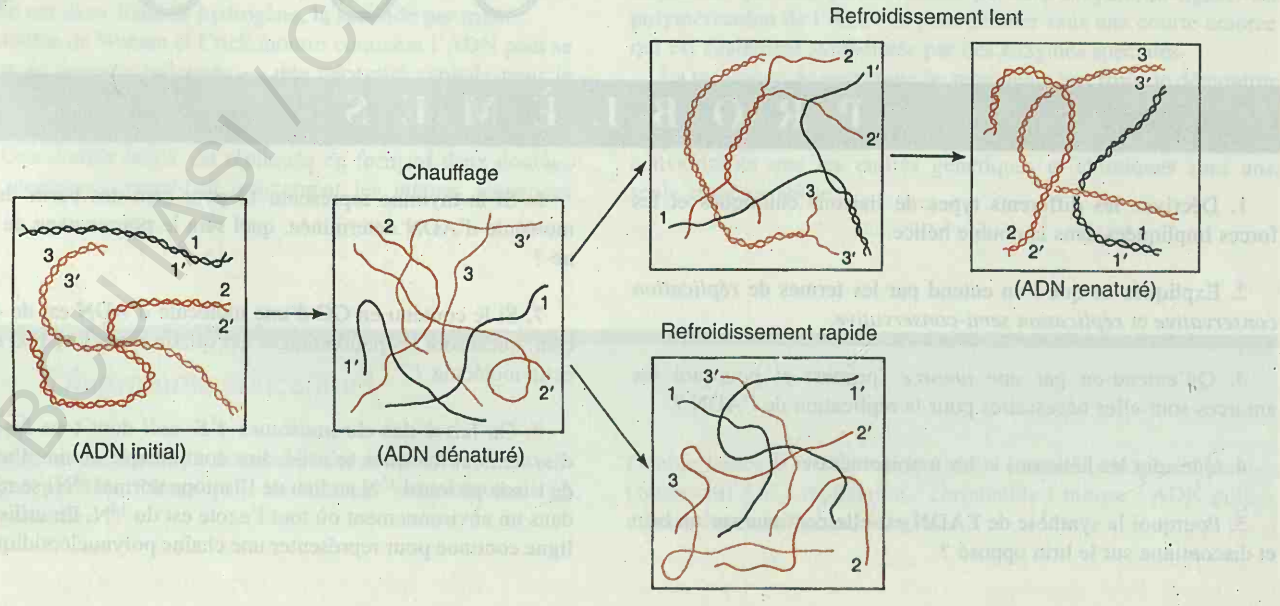
b. Sur Rama, la mitose produit trois cellules filles. Sur cette base, proposez un profil de réplication pour votre modèle d'ADN.

e. Considérez le processus de la méiose sur Rama. Quels commentaires ou conclusions pouvez-vous proposer ?

12. Si vous extrayez l'ADN du coliphage ϕX174, vous constaterez que sa composition est de 25 pour cent d'A, 33 pour cent de T, 24 pour cent de G et 18 pour cent de C. Ceci a-t-il du sens selon les règles de Chargaff ? Comment interpréteriez-vous ces résultats ? Comment un tel phage pourrait-il répliquer son ADN ?

13. La température à laquelle un échantillon d'ADN se dénature peut être utilisée pour estimer la proportion de G–C parmi ses paires de nucléotides. Sur quelle propriété cette détermination pourrait-elle se fonder et qu'indiquerait l'obtention d'une température de dénaturation élevée pour un échantillon d'ADN ?

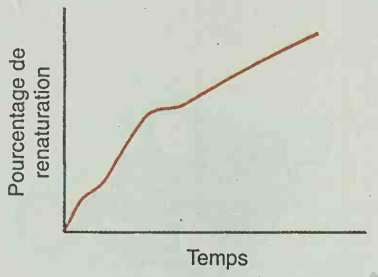
14. En 1960, Paul Doty et Julius Marmur observèrent que lorsque l'ADN est chauffé à 100°C toutes les liaisons hydrogène entre les brins complémentaires sont détruites et l'ADN devient



monocaténaire (voir la figure ci-dessous). Si la solution est refroidie lentement, une certaine quantité d'ADN biologiquement normal (par exemple, apte à transformer) est reformée. Ce processus de **réappariement** ou de **renaturation** a vraisemblablement lieu lorsque deux brins séparés se heurtent de manière telle qu'ils s'alignent et reconstituent la double hélice originale (voir la figure ci-dessous). Cette renaturation est très spécifique et très précise. Elle constitue dès lors un outil très puissant étant donné que des séquences de bases complémentaires provenant d'ADN *différents* vont également s'apparier après fusion et mélange. L'efficacité de la renaturation est par conséquent une mesure de la similitude de deux ADN.

Supposons maintenant que vous extrayez l'ADN d'un petit virus, le dénaturez et le laissez se renaturer avec l'ADN d'autres souches qui portent une délétion, une inversion ou une duplication. Que vous attendez-vous à voir lors d'un examen au microscope électronique ?

15. L'ADN extrait d'un mammifère est chauffé et dénaturé, et ensuite refroidi lentement pour permettre la renaturation. Le graphique ci-dessous montre les résultats obtenus. Il y a deux épaulements dans la courbe obtenue. Le premier indique la présence d'une région de l'ADN dont la renaturation est très rapide, tellement rapide en fait qu'elle a lieu avant que des interactions entre brins n'aient lieu.



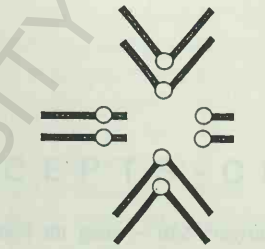
a. De quelle partie de l'ADN pourrait-il s'agir ?

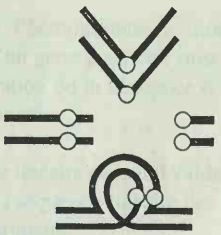
b. Le deuxième épaulement correspond également à une région qui se renature rapidement. Que suggère cette observation ?

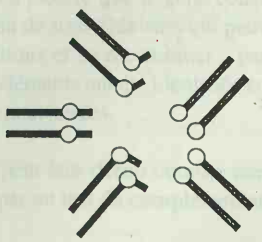
16. Imaginez des tests permettant de déterminer les relations physiques existant entre des séquences d'ADN hautement répétitives et uniques dans les chromosomes. (INDICATION : Il est possible de faire varier la taille des molécules d'ADN en modifiant les forces de cisaillement auxquelles elles sont soumises).

17. Des virus sont connus pour provoquer le cancer chez les souris. Vous possédez une préparation pure d'ADN viral, une préparation pure d'ADN des chromosomes de cellules de souris cancéreuses, et de l'ADN pur des chromosomes des cellules d'une souris normale. L'ADN viral va s'apparier spécifiquement avec l'ADN des cellules cancéreuses mais pas avec celui des cellules normales. Cherchez la signification de cette observation sur le plan génétique, au niveau moléculaire et sur le plan médical.

18. Ruth Kavenoff et Bruno Zimm ont imaginé une technique élégante pour mesurer la longueur maximale d'une molécule d'ADN en solution. Ils ont étudié des échantillons d'ADN des trois caryotypes de *Drosophila* montrés à la figure ci-dessous. Ils ont trouvé que les plus longues molécules dans les caryotypes (a) et (b) sont de longueurs voisines et sont environ deux fois plus longues que la plus longue molécule dans (c). Interprétez ces résultats.

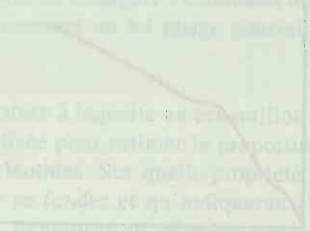

(a) Type sauvage


(b) Inversion péricentrique


(c) Translocation

19. Dans la technique des chromosomes arlequin, vous laissez s'accomplir *trois* cycles de réplication en présence de bromodésoxyuridine et colorez ensuite les chromosomes. Quel résultat vous attendez-vous à obtenir ?

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

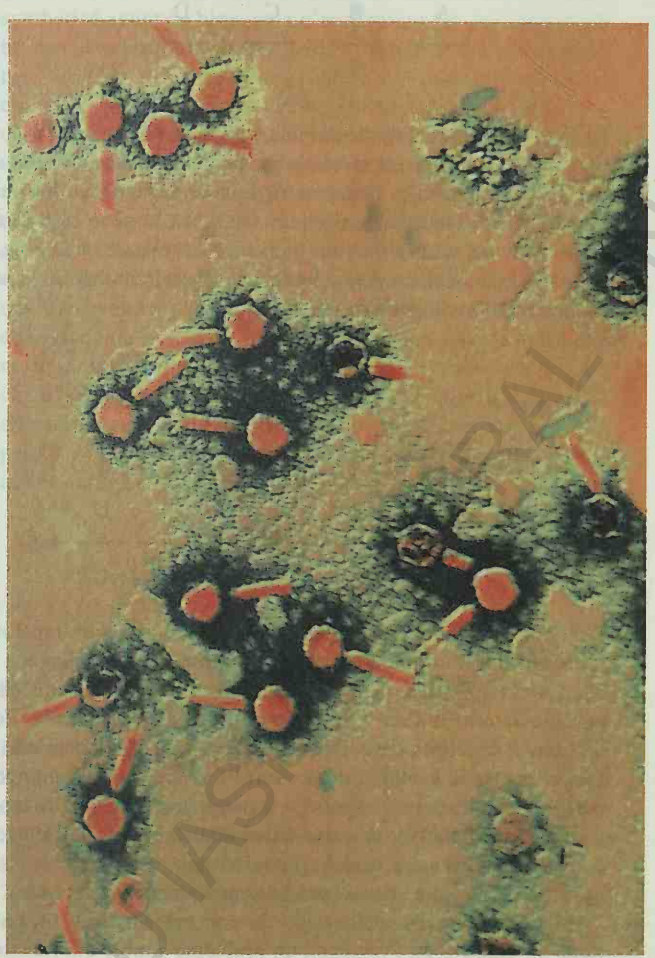


BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

12

La nature du gène



CONCEPTS-CLÉS

- L'hypothèse un gène – une enzyme postule que les gènes contrôlent la structure des protéines.
- L'étude de l'hémoglobine a montré que la mutation d'un gène peut être mise en relation avec l'altération de la séquence d'acides aminés d'une protéine.
- La séquence linéaire des nucléotides d'un gène détermine la séquence linéaire des acides aminés d'une protéine.
- L'analyse structurale fine des gènes *rII* du phage T4 a montré que le gène consiste en un alignement de sous-éléments qui peuvent subir des mutations et se recombiner ; par la suite, ces sous-éléments ont été identifiés comme des paires de nucléotides.
- Un gène peut être défini comme une unité de fonction par un test de complémentation.

Photographie au microscope électronique à transmission (coloration artificielle) d'un phage non identifié ; agrandissement, 58.000 X. (CNRI / Science Photo Library / Photo Researchers)

BCIT/ASTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Comment fonctionnent les gènes ?

Quelle est la nature du gène, et comment les gènes déterminent-ils les phénotypes ? Par exemple, pourquoi un allèle d'un gène produit-il un pois ridé alors qu'un autre produit un pois lisse ? Aujourd'hui, nous savons que toutes les réactions cellulaires sont catalysées par des enzymes dont chacune possède une structure tridimensionnelle spécifique qui est elle-même essentielle pour sa fonction. Nous savons que les gènes spécifient la structure des protéines, dont beaucoup sont des enzymes, et nous pouvons même établir une relation entre la structure du matériel génétique et celle des protéines. Le tableau 12-1 résume notre modèle actuel de la relation du génotype avec le phénotype.

Si nous avons pu aller si loin, c'est en nous efforçant de répondre aux questions suivantes :

1. Quelle est la structure physique du matériel génétique ?
2. Comment ce matériel génétique exerce-t-il ses effets ? (Ou, pour être plus précis, comment cette structure agit-elle ?)

Le chapitre 11 retrace la démonstration que l'ADN est le matériel héréditaire et décrit les étapes de l'élucidation de sa structure. Aux chapitres 12 et 13, nous examinons la manière dont ces gènes fonctionnent.

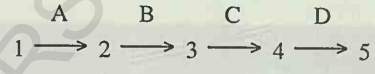
Les premiers indices quant à la fonction du gène vinrent de l'étude de l'homme. Au début de ce siècle, Archibald Garrod, un médecin, remarqua que plusieurs anomalies héréditaires de l'homme sont provoquées par des mutations récessives. Certaines de ces anomalies peuvent être mises directement en relation avec des défauts métaboliques qui affectent les activités biochimiques de l'organisme — une observation qui a suggéré la notion de «désordre héréditaire» du métabolisme. Nous savons maintenant que la phénylcétonurie, qui est causée par un allèle autosomique récessif, résulte de l'incapacité de transformer la phénylalanine en tyrosine. La phénylalanine s'accumule par conséquent et est transformée en acide phénylpyruvique, un produit toxique. De manière analogue, l'incapacité de convertir la tyrosine en un pigment, la mélanine, aboutit à l'albinisme. Les observations de Garrod attirèrent donc l'attention sur le contrôle du métabolisme par les gènes.

Tableau 12-1. Modèle de relation entre génotype et phénotype

1. Les traits caractéristiques d'un organisme sont déterminés par le phénotype de ses diverses parties, qui sont à leur tour déterminées par le phénotype des cellules qui les composent.
2. Le phénotype d'une cellule est déterminé par sa chimie interne, qui est spécifiée par les enzymes qui catalysent ses réactions métaboliques.
3. La fonction d'une enzyme dépend de sa structure tridimensionnelle spécifique, qui, à son tour, dépend de la séquence linéaire d'acides aminés de l'enzyme puisque la plupart des enzymes sont des protéines.
4. Les enzymes présentes dans une cellule, aussi bien que les protéines de structure, sont déterminées par le génotype de la cellule.
5. Les gènes spécifient la séquence linéaire des acides aminés des polypeptides et donc des protéines ; les gènes déterminent par conséquent les phénotypes.

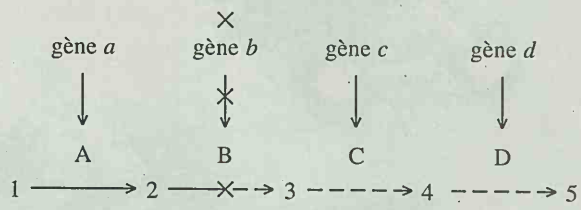
L'hypothèse «un gène – une enzyme»

L'explication de la vraie fonction du gène trouva son origine dans les recherches poursuivies pendant les années 1940 sur *Neurospora* par Georges Beadle et Edward Tatum, qui reçurent plus tard le prix Nobel pour leurs travaux. Avant de décrire leurs expériences, faisons un saut en avant et examinons quelques aspects des **voies biosynthétiques** telles que nous les comprenons aujourd'hui. Nous savons que les molécules sont synthétisées en une série d'étapes, chacune catalysée par une enzyme. Par exemple, une voie de biosynthèse pourrait comporter quatre étapes dont le produit initial est 1 et le produit final 5 :



Chaque étape est catalysée par une enzyme : A, B, C ou D. A son tour, chaque enzyme est spécifiée par un gène. Nous pourrions dire que le gène *a* spécifie l'enzyme A, le gène *b* l'enzyme B et ainsi de suite. Par conséquent, si nous inactivons le gène responsable d'une enzyme, nous éliminons une étape nécessaire de la voie.

Dans le schéma suivant, l'enzyme B est éliminée à la suite d'une mutation du gène *b* :



Dès lors, la cellule ne peut pas réaliser la réaction qui transforme 2 en 3. Nous sommes bloqués au composé 2, et ne pouvons pas aller plus loin. Mais que se passe-t-il si nous rajoutons différents produits intermédiaires ? Supposons, par exemple, que nous fournissions à la cellule les composés 3 ou 4. La cellule peut-elle dès lors effectuer la synthèse du produit final 5 ? Oui, ces composés permettent tous deux la synthèse puisque les étapes suivantes ne sont pas bloquées. Et qu'arrive-t-il si nous ajoutons davantage du composé 1 ? Rien, puisque le produit 1 ne peut pas être transformé en produit 5, une des étapes intermédiaires étant bloquée.

Mettons notre compréhension du concept de trajet biosynthétique à l'épreuve en examinant un problème simple qui illustre ce principe :

Supposons que nous avons isolé plusieurs mutants qui exigent le composé G pour la croissance. Tous les intermédiaires A à E de la voie biosynthétique sont connus, mais nous ignorons l'ordre dans lequel ils sont synthétisés par la cellule sauvage. Nous avons examiné l'aptitude de chacun de ces intermédiaires à supporter la croissance de chacun des mutants et avons obtenu les résultats suivants :

		Composé testé (+ = croissance ; – = pas de croissance)					
		A	B	C	D	E	G
Mutant	1	–	–	–	+	–	+
	2	–	+	–	+	–	+
	3	–	–	–	–	–	+
	4	–	+	+	+	–	+
	5	+	+	+	+	–	+

a. Quel est l'ordre des composés A à E dans la biosynthèse ? Comment aborder ce type de problème ? Voyons en premier lieu quel est le principe sous-jacent et dressons un schéma. Les points essentiels sont les suivants : Une mutation bloque une chaîne biosynthétique en éliminant une enzyme indispensable pour cette chaîne. Le mutant est dès lors privé d'un composé nécessaire dans la chaîne et est incapable de synthétiser tous les composés qui viennent après l'enzyme bloquée. Si nous fournissons un composé qui est normalement synthétisé avant ce bloc, cela n'améliorera pas les choses : le mutant sera toujours incapable de synthétiser les autres intermédiaires de la biosynthèse. Toutefois le mutant possède les enzymes qui sont exigées pour synthétiser ces composés ; donc si nous donnons le composé dont la synthèse est bloquée ou un autre qui vient après le bloc, le mutant pourra croître. Ainsi, dans la caractérisation de mutants possédant des blocs dans différentes étapes de la chaîne, les composés qui interviennent le plus tard dans cette chaîne permettront la croissance du plus grand nombre de mutants tandis que ceux qui interviennent le plus tôt dans la chaîne satisferont la croissance du plus petit nombre de mutants. Un coup d'œil à notre tableau montre que le composé qui permet la croissance du plus petit nombre de mutants est le composé E, qui n'en satisfait aucun, suivi par le composé A (un mutant), ensuite par C, B, D et G, le produit final. Nous pouvons maintenant tracer notre diagramme.

$$E \longrightarrow A \longrightarrow C \longrightarrow B \longrightarrow D \longrightarrow G$$

b. A quel point de la voie chaque mutant est-il bloqué ? Evidemment, un mutant bloqué entre E et A ne peut pas voir sa croissance satisfaite par E, mais bien par tous les autres intermédiaires. Nous voyons donc que le mutant 5 doit être bloqué dans la conversion de E en A. Nous constatons aussi que l'exigence du mutant 4 ne peut pas être satisfaite par E ou A ; il doit donc être bloqué dans la conversion de A en C. Par un raisonnement similaire, nous aboutissons à l'ordre 5 – 4 – 2 – 1 – 3 que nous pouvons introduire de la manière suivante dans le schéma :

$$E \xrightarrow{5} A \xrightarrow{4} C \xrightarrow{2} B \xrightarrow{1} D \xrightarrow{3} G$$

Maintenant nous pouvons comprendre comment Beadle et Tatum ont réalisé pour la première fois une telle expérience en utilisant un trajet biosynthétique particulier de *Neuropora.*

Les expériences de Beadle et Tatum

Beadle et Tatum analysèrent des mutants de *Neurospora,* un champignon possédant un génome haploïde. Ils irradièrent d'abord *Neurospora* pour provoquer des mutations et examinèrent ensuite les cultures des ascospores irradiées pour identifier les phénotypes mutants qui les intéressaient. Ils détectèrent de nombreux mutants **auxotrophes** — des souches qui ne pouvaient pas croître sur un milieu minimum si on ne leur fournissait pas un ou des nutriments spécifiques. Dans chaque cas, le caractère auxotrophe correspondait à une seule mutation ; chaque souche fournissait un rapport 1 : 1 lorsqu'elle était croisée avec une souche de génotype sauvage (rappelez-vous que *Neurospora* est haploïde). La figure 12-1 décrit le protocole suivi par Beadle et Tatum.

Un ensemble de mutants exigeaient l'arginine pour croître sur un milieu minimum. Ces mutants fournirent le point de départ de tout le travail ultérieur de Beadle et Tatum. Tout d'abord ils constatèrent que ces mutations étaient localisées en trois endroits différents sur des chromosomes distincts, même si le même supplément (l'arginine) comblait l'exigence de tous les mutants. Appelons ces trois loci les gènes *arg-1, arg-2* et *arg-3.* Beadle et Tatum découvrirent que les auxotrophes correspondant à chacun des trois loci différaient par leurs réponses à l'ornithine et à la citrulline, composés biochimiques apparentés à l'arginine (figure 12-2). Les mutants *arg-1* croissaient sur un milieu minimum suppléé avec de l'ornithine, de la citrulline ou de l'arginine. Les mutants *arg-2* se développaient en présence de citrulline ou d'arginine mais pas en présence d'ornithine. Enfin, les mutants *arg-3* ne croissaient que si l'arginine leur était fournie. Ces comportements sont décrits de manière explicite dans le tableau 12-2.

On savait déjà que des composés apparentés pouvaient être transformés dans la cellule grâce à des catalyseurs appelés enzymes. Sur la base des propriétés de ces mutants *arg,* Beadle et Tatum et leurs collègues présentèrent un modèle pour ces transformations chez *Neurospora* :

$$\text{précurseur} \xrightarrow{\text{enzyme X}} \text{ornithine} \xrightarrow{\text{enzyme Y}} \text{citrulline} \xrightarrow{\text{enzyme Z}} \text{arginine}$$

Voyez combien il est aisé au moyen de cette relation d'expliquer les trois classes de mutants montrées au tableau 12-2. Les mutants *arg-1* possèdent une enzyme X défectueuse. Ils sont incapables de convertir le précurseur en ornithine, donc de réaliser la première étape de la formation de l'arginine. Toutefois, possédant des enzymes Y et Z normales, les mutants *arg-1,* peuvent produire l'arginine lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu additionné d'ornithine ou de citrulline. Les mutants *arg-2* sont dépourvus d'enzyme Y et les mutants *arg-3* d'enzyme Z. Ainsi, une mutation touchant un gène déterminé n'affecte la production que d'une seule enzyme. L'enzyme défectueuse introduit un blocage dans le trajet biosynthétique considéré. Ce blocage peut être contourné par la fourniture aux cellules de n'importe quel intermédiaire qui intervient normalement après lui dans la voie biosynthétique.

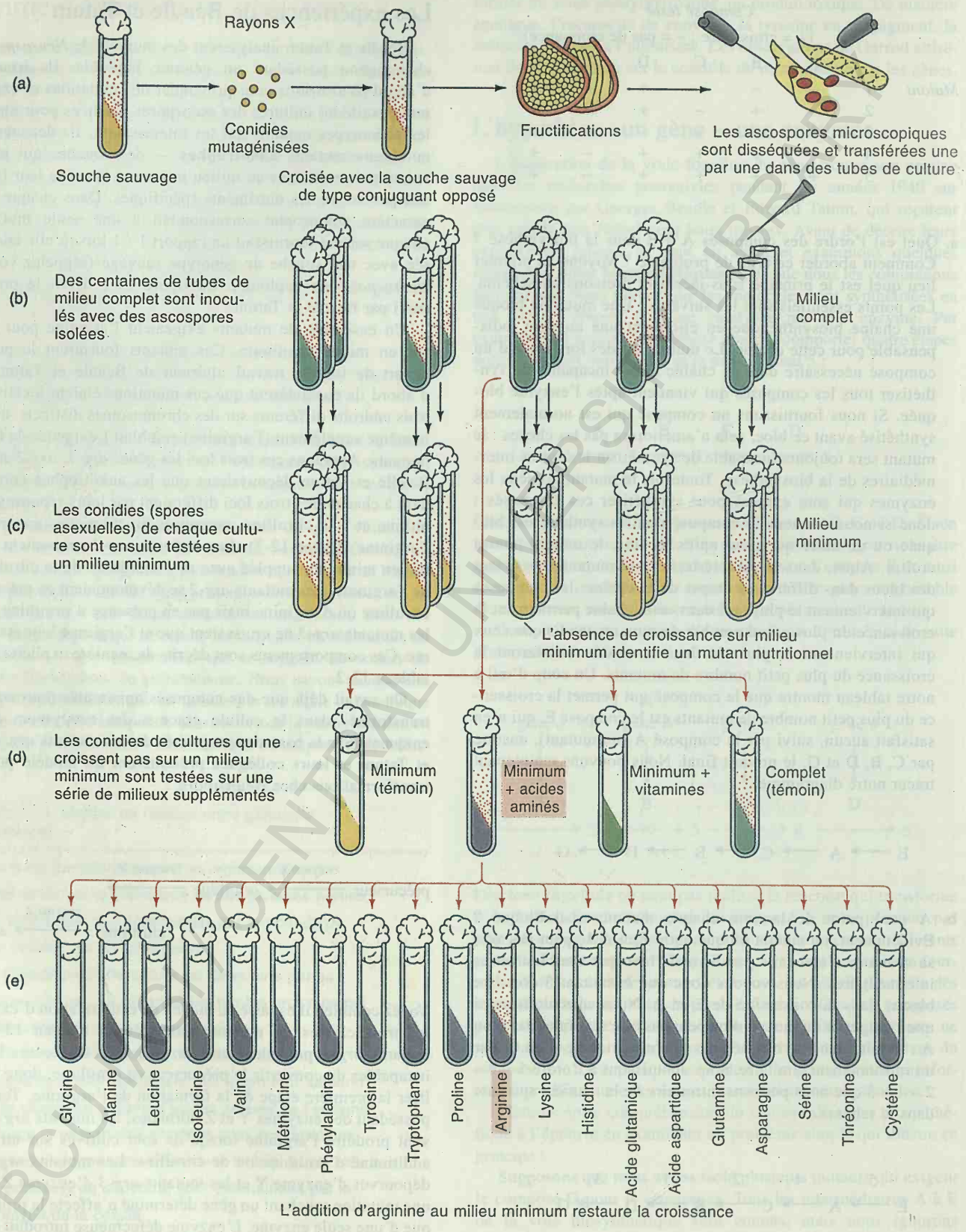


Figure 12-1. Le protocole suivi par Beadle et Tatum. Voir le chapitre 6 pour une revue du cycle de vie et de la génétique de *Neurospora*. (Little, Brown & Co.)

BCU LAUSANNE UNIVERSITAIRE

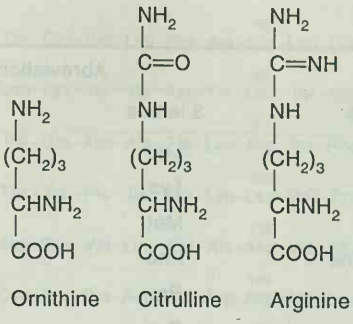
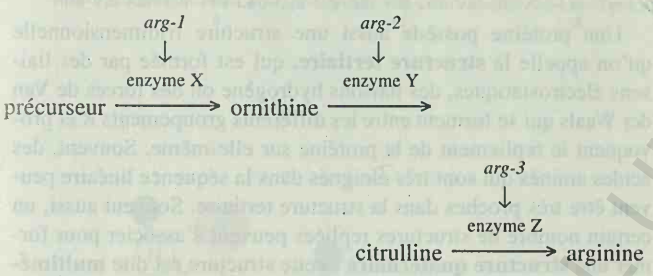


Figure 12-2. Structure chimique de l'arginine et de composés apparentés, la citrulline et l'ornithine. Dans les travaux de Beadle et Tatum, différents mutants auxotrophes *arg* de *Neurospora* s'avérèrent capables de croître lorsque le milieu était additionné de citrulline ou d'ornithine, au lieu d'arginine.

Nous pouvons maintenant proposer un modèle biochimique plus complet :



Notez que ce modèle est entièrement dérivé des propriétés des mutants identifiés par l'analyse génétique. Ce n'est que plus tard que l'existence de la voie biosynthétique et la présence d'enzymes défectueuses furent démontrées par des expériences biochimiques indépendantes.

Ce modèle, qui est connu comme l'**hypothèse un gène — une enzyme,** constitua la première réussite spectaculaire de l'étude de la fonction des gènes : d'une manière quelconque, les gènes étaient responsables de la fonction des enzymes et chaque gène contrôlait apparemment une enzyme spécifique. D'autres chercheurs obtinrent des résultats analogues pour d'autres trajets biosynthétiques et l'hypothèse fut bientôt acceptée de manière générale. Elle fut affinée par la suite, comme nous le verrons plus loin dans ce chapitre. Néanmoins, l'hypothèse un gène — une enzyme devint un des grands concepts unificateurs de la biologie parce qu'elle jetait un pont entre les concepts et techniques de recherche de la génétique et ceux de la biochimie.

Tableau 12-2. Croissance des mutants *arg* en présence de différents suppléments

	Supplément		
Mutant	Ornithine	Citrulline	Arginine
	(+ = croissance ; – = pas de croissance)		
arg-1	+	+	+
arg-2	–	+	+
arg-3	–	–	+

Message Les gènes contrôlent les réactions biochimiques en contrôlant la production des enzymes.

Arrêtons-nous un instant pour évaluer la signification de cette découverte. Résumons son contenu :

1. Les réactions biochimiques in vivo (dans la cellule vivante) s'organisent en une série d'étapes réactionnelles séparées.
2. Chaque réaction est catalysée spécifiquement par une seule enzyme.
3. Chaque enzyme est spécifiée par un seul gène.

Les relations gène — protéine

L'hypothèse un gène — une enzyme représentait une étape importante dans la compréhension de la fonction des gènes, mais *comment* exactement les gènes contrôlaient-ils le fonctionnement des enzymes ? Ceux-ci sont des **protéines** et il nous faut passer en revue les éléments fondamentaux de la structure de ces protéines avant d'aborder l'étape suivante de l'étude de la fonction des gènes.

La structure des protéines

En termes simples, une **protéine** est une molécule composée d'**acides aminés** attachés bout à bout pour former une chaîne linéaire. La formule générale d'un acide aminé est H_2N — CHR — COOH, dans laquelle le groupement R peut être n'importe quoi, depuis un atome d'hydrogène (comme dans la glycine) jusqu'à un cycle complexe (comme dans le tryptophane). Il y a 20 acides aminés courants dans les protéines des organismes vivants (tableau 12-3), chacun comportant un groupe R différent. Les acides aminés sont tenus ensemble dans les protéines par des liaisons chimiques covalentes appelées des **liaisons peptidiques.** Une liaison peptidique est formée au cours d'une réaction de condensation qui implique l'élimination d'une molécule d'eau (figure 12-3).

Plusieurs acides aminés sont liés ensemble par des liaisons peptidiques pour former une molécule appelée un **polypeptide** ; les protéines que l'on trouve dans les organismes vivants sont de grands polypeptides. La chaîne α de l'hémoglobine humaine, par exemple, comporte 141 acides aminés et certaines protéines en contiennent plus de 1000.

Les protéines possèdent une structure complexe que l'on considère traditionnellement comme comportant quatre niveaux. L'arrangement linéaire des acides aminés dans la chaîne polypeptidique est appelé la **structure primaire** de la protéine. La figure 12-4 montre la structure primaire de la tryptophane synthétase (une enzyme) et de l'insuline bovine (une hormone).

La **structure secondaire** d'une protéine se rapporte aux interactions intervenant entre des acides aminés qui sont proches les uns des autres dans la chaîne linéaire. Cet arrangement spatial résulte du fait que les polypeptides peuvent se replier pour former des structures qui se répètent régulièrement et sont stabilisées par des liaisons hydrogène entre les groupements CO et NH des différents résidus. Deux de ces structures périodiques de base sont l'hélice α (figure 12-5) et le feuillet plissé β (figure 12-6).

BCU LAUSANNE

Tableau 12-3. Les 20 acides aminés habituels chez les organismes vivants

Acide Aminé	Abréviations		Acide aminé	Abréviations	
	3 lettres	1 lettre		3 lettres	1 lettre
Alanine	Ala	A	Leucine	Leu	L
Arginine	Arg	R	Lysine	Lys	K
Asparagine	Asn	N	Méthionine	Met	M
Acide aspartique	Asp	D	Phénylalanine	Phe	F
Cystéine	Cys	C	Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q	Sérine	Ser	S
Acide glutamique	Glu	E	Thréonine	Thr	T
Glycine	Gly	G	Tryptophane	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

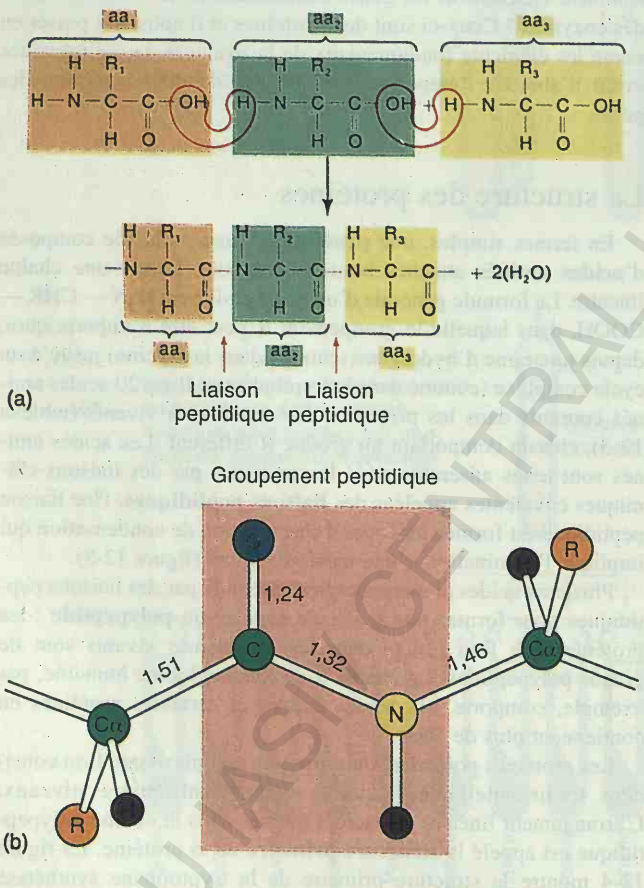


Figure 12-3. La liaison peptidique. (a) Un polypeptide est formé par l'élimination d'une molécule d'eau entre des acides aminés pour former des liaisons peptidiques. Chaque aa représente un acide aminé. R_1, R_2 et R_3 représentent les groupements latéraux qui différencient les acides aminés. R peut être n'importe quoi depuis un atome d'hydrogène (comme dans la glycine) jusqu'à un cycle complexe (comme dans le tryptophane). (b) Le groupement peptidique est un module plan et rigide où les groupements R font saillie par rapport au squelette C—N. Les longueurs standard des liaisons (en angstroms) sont indiquées. (La partie B provient de L. Stryer, *Biochemistry*, 4ème édit. Copyright ©1995 par W. H.Freeman and Company.)

Une protéine possède aussi une structure tridimensionnelle qu'on appelle la **structure tertiaire,** qui est formée par des liaisons électrostatiques, des liaisons hydrogène ou des forces de Van der Waals qui se forment entre les différents groupements R et provoquent le repliement de la protéine sur elle-même. Souvent, des acides aminés qui sont très éloignés dans la séquence linéaire peuvent être très proches dans la structure tertiaire. Souvent aussi, un certain nombre de structures repliées peuvent s'associer pour former une **structure quaternaire ;** cette structure est dite **multimérique** parce qu'elle est composée de plusieurs chaînes polypeptidiques ou monomères.

La figure 12-7 décrit les quatre niveaux de structure des protéines. Dans la figure 12-7c nous voyons la structure tertiaire de la myoglobine. Voyez comment l'hélice α est repliée sur elle-même pour produire la structure à trois dimensions de la protéine. La figure 12-7d montre la combinaison de quatre sous-unités (deux chaînes α et deux chaînes β) pour former la structure quaternaire de l'hémoglobine. Les figures 12-8 et 12-9 montrent les structures de la myoglobine et de l'hémoglobine de manière plus détaillée. L'association des sous-unités pour former une enzyme multimérique peut parfois se voir directement au microscope électronique (figure 12-10).

Beaucoup de protéines possèdent une structure compacte ; on les appelle des **protéines globulaires.** Les enzymes et les anticorps sont parmi les protéines globulaires les plus importantes. Mais il existe aussi des protéines déroulées, les **protéines fibreuses** qui sont les composants principaux de structures comme les cheveux et les muscles.

Message La séquence linéaire d'une protéine se replie pour acquérir une conformation tridimensionnelle unique. Cette conformation crée des sites spécifiques auxquels les substrats se lient et où se déroulent les réactions catalytiques. La structure tridimensionnelle d'une protéine, qui est cruciale pour son activité, est déterminée uniquement par sa structure primaire (sa séquence linéaire d'acides aminés). Par conséquent, les gènes peuvent contrôler la fonction des enzymes en déterminant la structure primaire des protéines.

UIAST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(a)

Met-Glu-Arg-Tyr-Glu-Ser-Leu-Phe-Ala-Gln-Leu-Lys-Glu-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Phe-Val-Pro-Phe-Val-Thr-Leu-Gly-Asp-Pro-Gly-Ile-
Glu-Gln-Ser-Leu-Lys-Ile-Ile-Asp-Thr-Leu-Ile-Glu-Ala-Gly-Ala-Asp-Ala-Leu-Glu-Leu-Gly-Ile-Pro-Phe-Ser-Asp-Pro-Leu-Ala-Asp-
Gly-Pro-Thr-Ile-Gln-Asn-Ala-Thr-Leu-Arg-Ala-Phe-Ala-Ala-Gly-Val-Thr-Pro-Ala-Gln-Cys-Phe-Glu-Met-Leu-Ala-Leu-Ile-Arg-Gln-
Lys-His-Pro-Thr-Ile-Pro-Ile-Gly-Leu-Leu-Met-Tyr-Ala-Asn-Leu-Val-Phe-Asn-Lys-Gly-Ile-Asp-Glu-Phe-Tyr-Ala-Gln-Cys-Glu-Lys-
Val-Gly-Val-Asp-Ser-Val-Leu-Val-Ala-Asp-Val-Pro-Val-Gln-Glu-Ser-Ala-Pro-Phe-Arg-Gln-Ala-Ala-Leu-Arg-His-Asn-Val-Ala-Pro-
Ile-Phe-Ile-Cys-Pro-Pro-Asn-Ala-Asp-Asp-Asp-Leu-Leu-Arg-Gln-Ile-Ala-Ser-Tyr-Gly-Arg-Gly-Tyr-Thr-Tyr-Leu-Leu-Ser-Arg-Ala-
Gly-Val-Thr-Gly-Ala-Glu-Asn-Arg-Ala-Ala-Leu-Pro-Leu-Asn-His-Leu-Val-Ala-Lys-Leu-Lys-Glu-Tyr-Asn-Ala-Ala-Pro-Pro-Leu-Gln-
Gly-Phe-Gly-Ile-Ser-Ala-Pro-Asp-Gln-Val-Lys-Ala-Ala-Ile-Asp-Ala-Gly-Ala-Ala-Gly-Ala-Ile-Ser-Gly-Ser-Ala-Ile-Val-Lys-Ile-
Ile-Glu-Gln-His-Asn-Ile-Glu-Pro-Glu-Lys-Met-Leu-Ala-Ala-Leu-Lys-Val-Phe-Val-Gln-Pro-Met-Lys-Ala-Ala-Thr-Arg-Ser

(b)

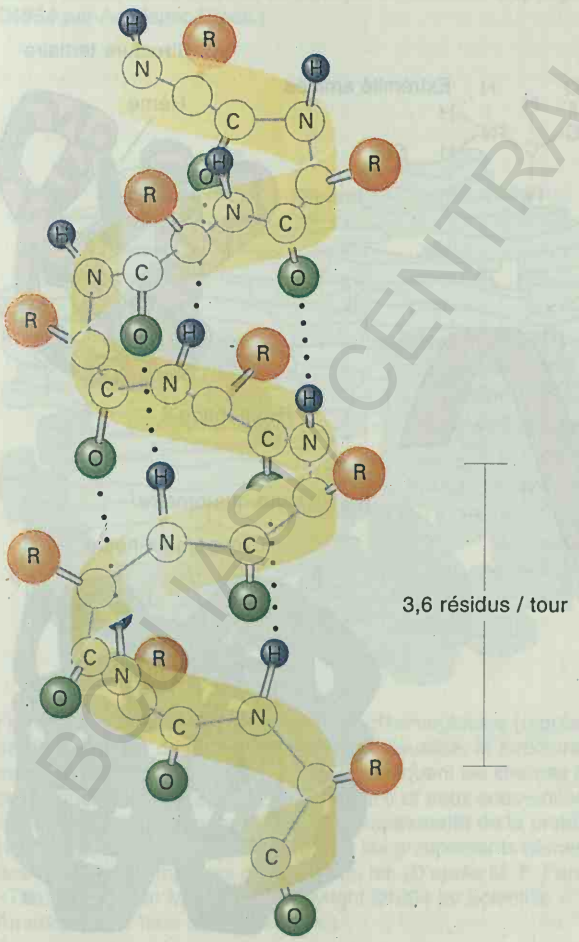
Chaîne A

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Ala-Ser-Val-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn

Chaîne B

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala

Figure 12-4. Séquences de deux protéines. (a) La protéine A de la tryptophane synthétase d' *E. coli*, longue de 268 acides aminés. (b) La protéine de l'insuline bovine. Notez que la cystéine est le seul acide aminé à pouvoir participer à la formation de «ponts disulfures», parce qu'il contient du soufre.



La détermination de la séquence des protéines

En purifiant une protéine particulière, nous pouvons déterminer les proportions des différents acides aminés qui la constituent. Mais la protéine n'est pas formée par l'alignement au hasard de quantités fixes de ces acides aminés ; chaque protéine possède une séquence caractéristique et unique. Pour un petit polypeptide, la séquence des acides aminés peut être déterminée en enlevant les acides aminés un par un et en les identifiant. Par contre, les grands polypeptides ne peuvent pas être «séquencés» de cette manière.

Frederick Sanger a développé une remarquable méthode de détermination de la séquence des longs polypeptides. Il existe différentes **enzymes protéolytiques** qui, parmi les liaisons peptidiques des protéines, scindent uniquement celles qui unissent des acides aminés spécifiques. Une grande protéine peut être clivée par ces enzymes en un certain nombre de fragments qui peu-

Figure 12-5. L'hélice α, qui est souvent la base de la structure secondaire d'une protéine. Chaque groupement R est la chaîne latérale spécifique d'un acide aminé. Les points gris sont des liaisons hydrogène faibles qui lient le groupement CO du résidu *n* au groupement NH du résidu *n+4* et stabilisent la structure hélicoïdale. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 by Scientific American Books, Inc.)

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

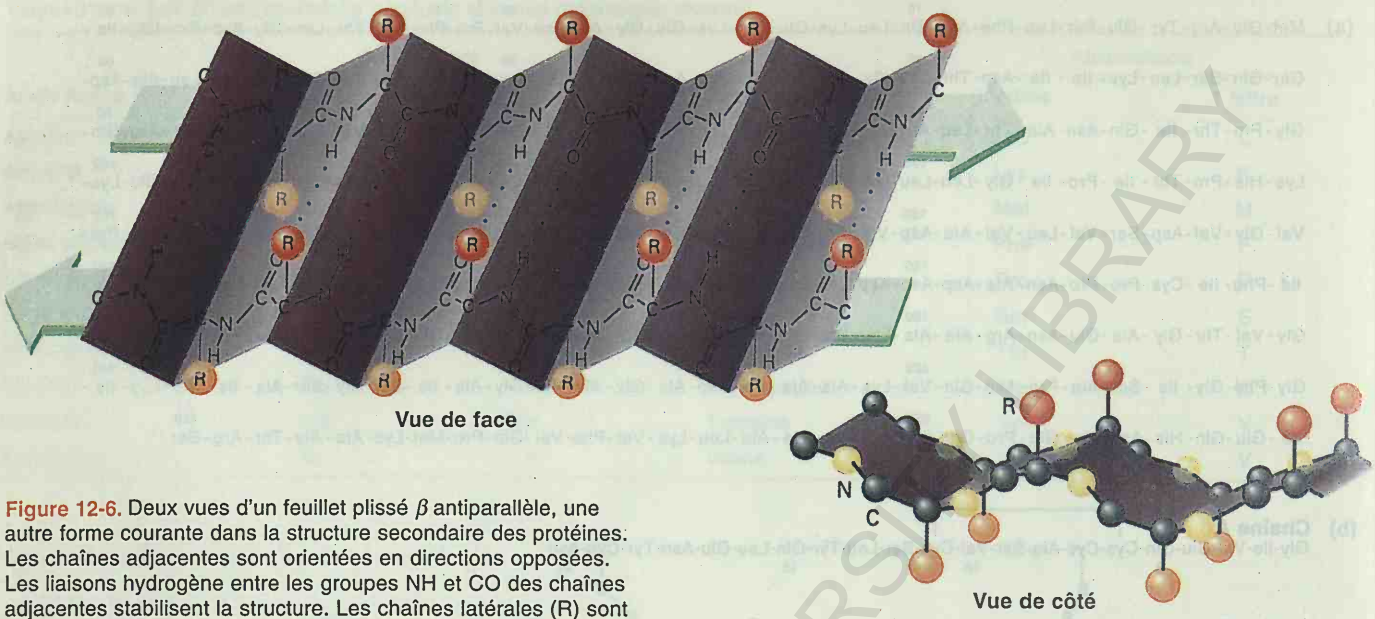


Figure 12-6. Deux vues d'un feuillet plissé β antiparallèle, une autre forme courante dans la structure secondaire des protéines. Les chaînes adjacentes sont orientées en directions opposées. Les liaisons hydrogène entre les groupes NH et CO des chaînes adjacentes stabilisent la structure. Les chaînes latérales (R) sont situées au-dessus et en dessous du plan du feuillet. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 by Scientific American Books, Inc.)

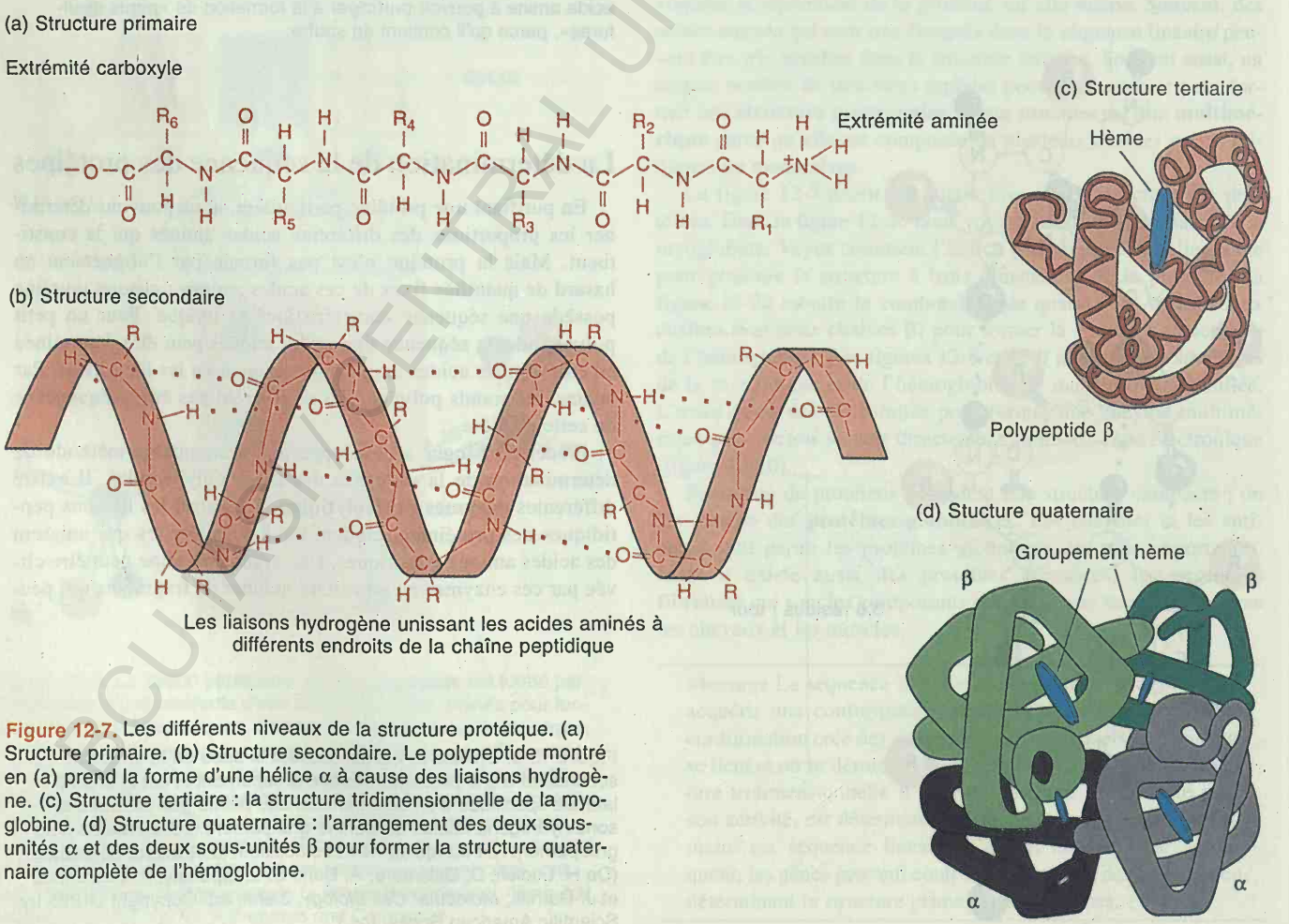


Figure 12-7. Les différents niveaux de la structure protéique. (a) Sructure primaire. (b) Structure secondaire. Le polypeptide montré en (a) prend la forme d'une hélice α à cause des liaisons hydrogène. (c) Structure tertiaire : la structure tridimensionnelle de la myoglobine. (d) Structure quaternaire : l'arrangement des deux sous-unités α et des deux sous-unités β pour former la structure quaternaire complète de l'hémoglobine.

SECURITAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

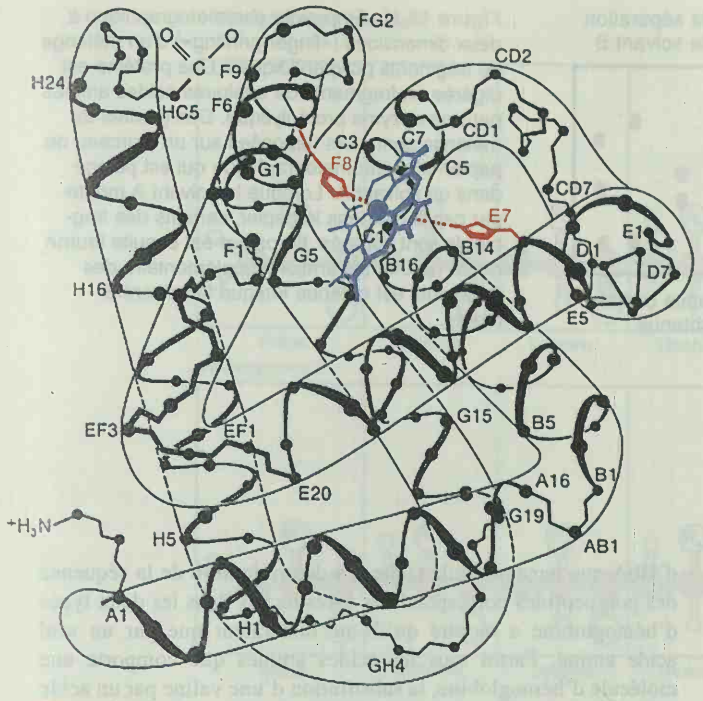


Figure 12-8. Structure tertiaire repliée de la myoglobine, une protéine de stockage de l'oxygène. Chaque point représente un acide aminé. Le groupement hème, un cofacteur qui facilite la liaison de l'oxygène, est montré en bleu. (D'après L Stryer, *Biochemistry,* 2ème éd. Copyright 1981 by L. Stryer. Basé sur R. E. Dickerson, *The Proteins,* 2ème éd., vol. 2. Edité par H. Neurath. Copyright ©1964 par Academic Press.)

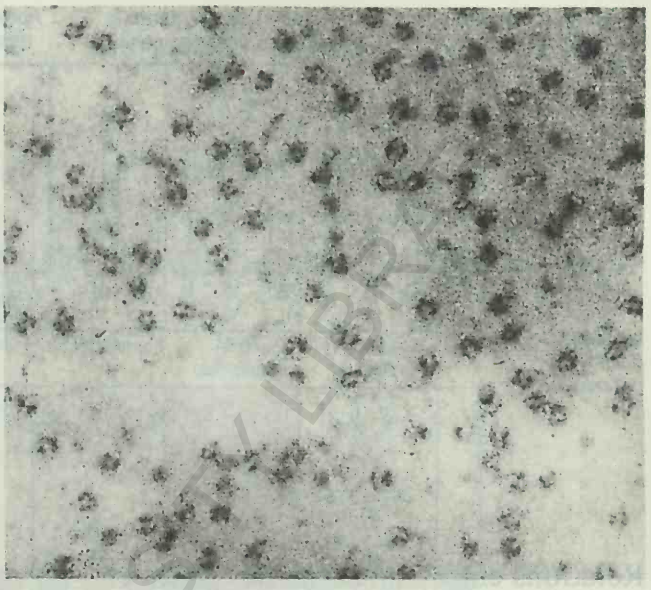


Figure 12-10. Photographie au microscope électronique de l'enzyme aspartate transcarbamylase. Chaque petit objet est une molécule d'enzyme. Notez la structure quaternaire : l'enzyme est composée de sous-unités (Photographie de Jack D. Griffith.)

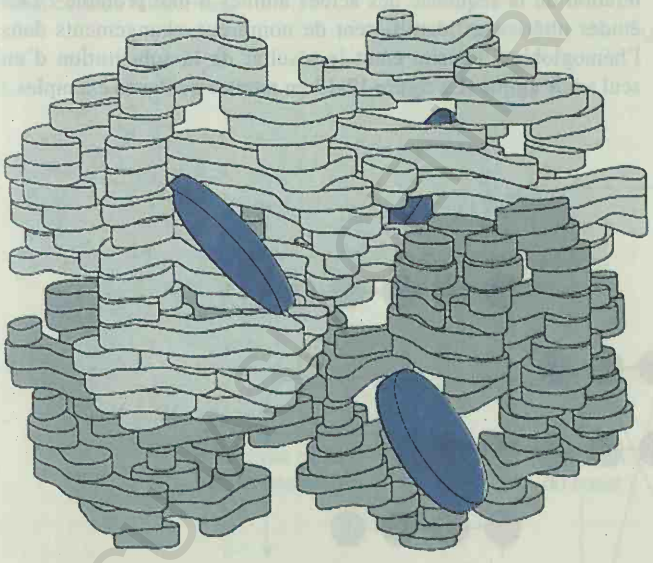


Figure 12-9. Un modèle de la molécule d'hémoglobine (représentée par l'empilement de formes aplaties pour visualiser la structure tridimensionnelle). Les ombrages différents indiquent les chaînes polypeptidiques différentes, deux sous-unités α et deux sous-unités β qui s'associent pour former la structure quaternaire de la protéine (voir la figure 12-7d). Les disques sont les groupements hèmes — des structures complexes contenant du fer. (D'après M. F. Perutz, «The Hemoglobin Molecule». Copyright ©1964 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

vent ensuite être séparés selon leur vitesse de migration dans un solvant sur un papier chromatographique. Comme les vitesses de migration des différents fragments varient considérablement selon les solvants, la **chromatographie à deux dimensions** permet d'améliorer la séparation des fragments (figure 12-11). Dans cette technique, le mélange de fragments est séparé dans un premier solvant ; ensuite le papier est tourné de 90° et un autre solvant est utilisé.

Lorsque le papier est traité avec un colorant, les polypeptides apparaissent comme des taches sur un chromatogramme que l'on appelle l'**empreinte digitale** (ou finger-print) de la protéine. Chacune des taches peut-être découpée et les fragments polypeptidiques élués du papier. Comme les taches ne contiennent que de courts polypeptides, leurs séquences d'acides aminés sont aisées à déterminer.

En utilisant différentes enzymes protéolytiques qui clivent la protéine à des endroits différents, on peut répéter le processus pour obtenir des jeux de fragments différents. Les fragments des diverses expériences se chevauchent, parce que les clivages se font à des endroits différents pour chaque traitement. La détermination de la séquence se résume alors à trouver l'ordre des fragments — ce qui revient à peu près à résoudre un jeu de patience ou à reconstituer un puzzle (figure 12-12).

Grâce à l'utilisation cette élégante technique, Sanger a confirmé que la séquence des acides aminés (aussi bien que les quantités des différents acides aminés) est spécifique d'une protéine déterminée. En d'autres mots, c'est la séquence des acides aminés qui fait que l'insuline est l'insuline.

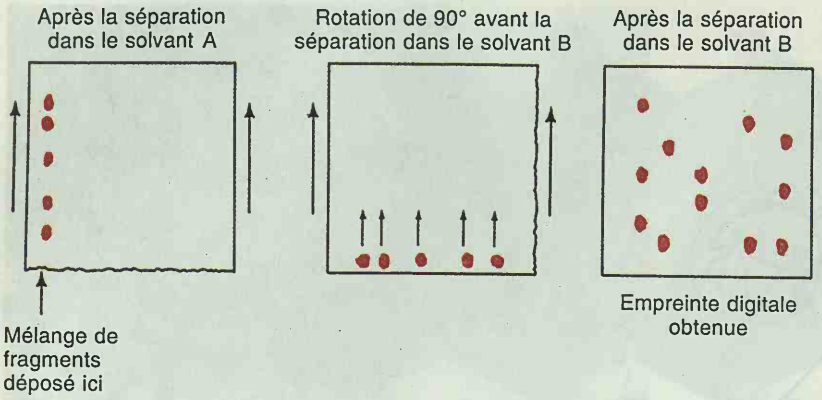


Figure 12-11. Empreinte chromatographique à deux dimensions («finger printing») d'un mélange de fragments polypeptidiques. Une protéine est digérée en fragments de quelques acides aminés par une enzyme protéolytique. Des gouttes du mélange sont alors déposées sur un morceau de papier-filtre chromatographique qui est plongé dans un solvant A. Lorsque le solvant A monte par capillarité dans le papier, certains des fragments sont séparés. Le papier est ensuite tourné de 90° et une séparation supplémentaire des fragments est obtenue lorsque le solvant B monte.

Relations entre mutations des gènes et altérations des protéines

Nous savons maintenant que le changement d'un seul acide aminé suffit parfois à modifier la fonction d'une enzyme. Ceci fut établi pour la première fois en 1957 par Vernon Ingram en étudiant une protéine globulaire, l'hémoglobine — la molécule qui transporte l'oxygène dans les globules rouges. Comme nous l'avons vu dans les figures 12-7d et 12-9, l'hémoglobine comporte quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes α identiques comportant chacune 141 acides aminés et deux chaînes β identiques qui en contiennent chacune 146.

Ingram compara l'hémoglobine A (HbA) des individus adultes normaux avec l'hémoglobine S (HbS), la protéine d'individus homozygotes pour le gène muté qui provoque l'anémie à cellules falciformes, une maladie dans laquelle les globules rouges prennent la forme de faucilles (voir la figure 4-2). Par la méthode de Sanger, Ingram constata que l'empreinte d'HbS ne diffère de celle d'HbA que par une seule tache. La détermination de la séquence des polypeptides correspondants à ces taches dans les deux types d'hémoglobine a montré qu'ils ne différaient que par un seul acide aminé. Parmi tous les acides aminés que comporte une molécule d'hémoglobine, la substitution d'une valine par un acide glutamique à la position 6 de la chaîne β suffit à produire l'hémoglobine défectueuse (figure 12-13). Cette erreur d'un seul acide aminé dans une protéine peut hâter la mort des malades qui possèdent une HbS, s'ils ne reçoivent par une assistance médicale adéquate. La figure 12-14 montre comment cette mutation d'un gène mène finalement aux symptômes de l'anémie à cellules falciformes que nous avons vus dans la figure 1-13.

Voyez ce qu'Ingram a réalisé : il a démontré qu'une mutation bien définie par l'analyse génétique pouvait être associée à l'altération de la séquence des acides aminés d'une protéine ! Des études ultérieures identifièrent de nombreux changements dans l'hémoglobine, chacun étant le résultat de la substitution d'un seul acide aminé (La figure 12-15 en montre quelques exemples.)

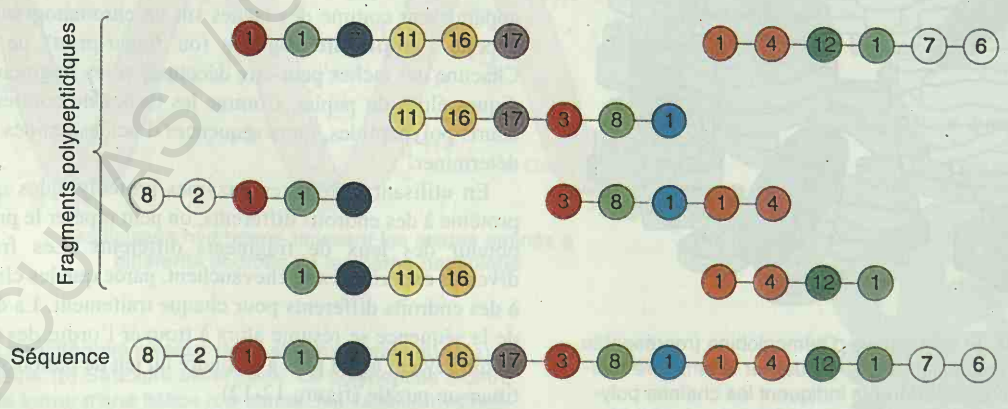


Figure 12-12. Alignement des fragments polypeptidiques pour reconstruire la séquence d'acides aminés entière. Comme on le montre ici, on peut faire agir différentes enzymes protéolytiques sur la même protéine pour obtenir des empreintes différentes. La séquence d'acides aminés de chaque tache peut être déterminée assez aisément et, en raison du chevauchement des séquences d'acides aminés des différentes taches dans les différentes empreintes, il est possible de déterminer toute la séquence d'acides aminés de la protéine. Utilisant ce procédé, Sanger mit environ six ans pour déterminer la séquence de la molécule de l'insuline, une relativement petite protéine.

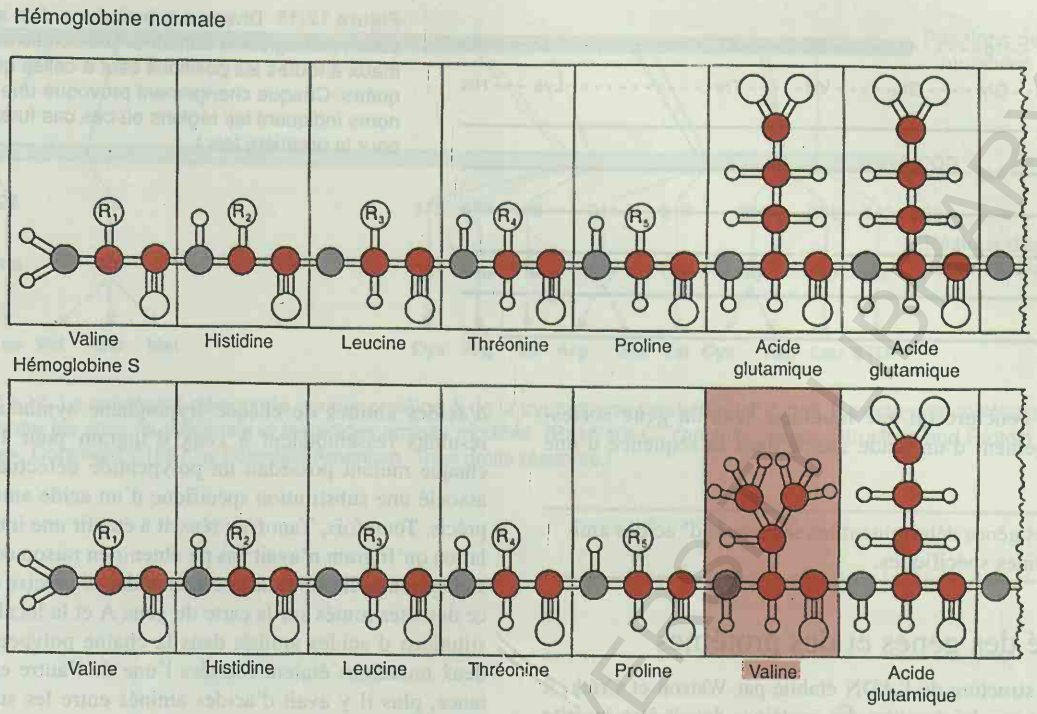
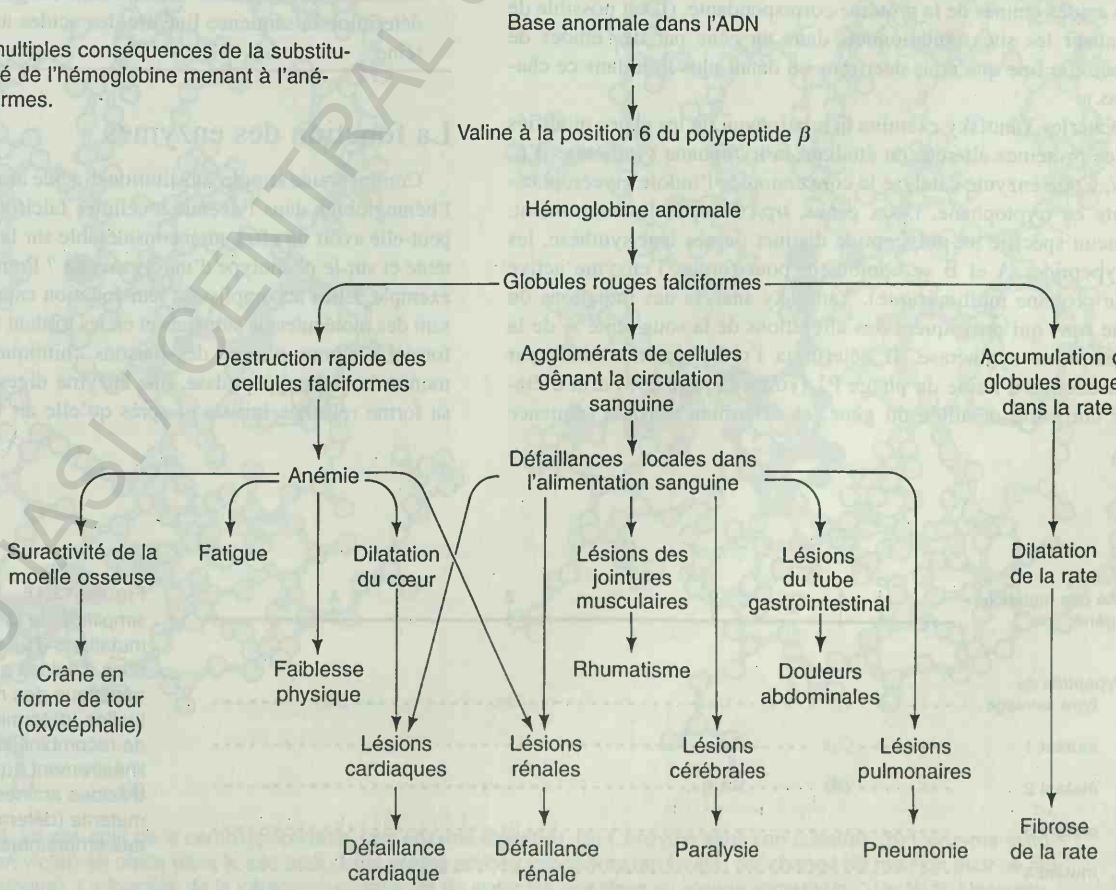


Figure 12-13. La différence au niveau moléculaire entre un individu normal et un individu souffrant d'anémie à cellules falciformes. Seuls les sept premiers acides aminés sont montrés ; ceux qui ne sont pas montrés sont tous identiques. (D'Anthony Cerami et Charles M. Peterson, «Cyanate and Sickle-Cell Disease». Copyright ©1975 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

Figure 12-14. Les multiples conséquences de la substitution d'un acide aminé de l'hémoglobine menant à l'anémie à cellules falciformes.



BCU - ASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

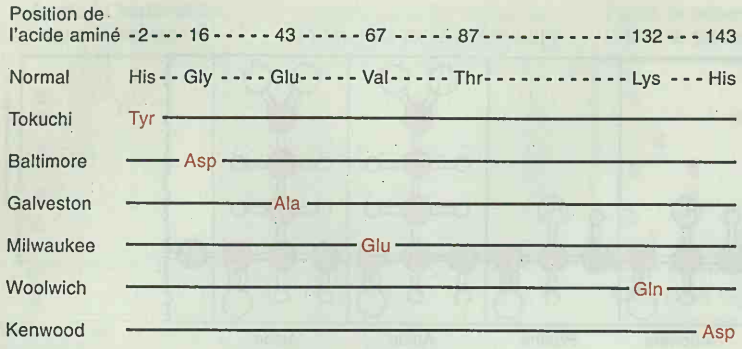


Figure 12-15. Diverses substitutions d'un seul acide aminé dans l'hémoglobine humaine. Les acides aminés sont normaux à toutes les positions sauf à celles qui sont indiquées. Chaque changement provoque une maladie. (Les noms indiquent les régions où ces cas furent observés pour la première fois.)

Nous pouvons conclure qu'une mutation dans un gène correspond au changement d'un acide aminé dans la séquence d'une protéine.

Message Les gènes déterminent les séquences d' acides aminés de protéines spécifiques.

Colinéarité des gènes et des protéines

Une fois la structure de l'ADN établie par Watson et Crick, il devint apparent que la structure des protéines devait être inscrite dans la séquence linéaire des nucléotides de cet ADN. (Nous verrons au chapitre 13 comment ce code a été déchiffré.) Après la démonstration par Ingram qu'une mutation peut altérer un acide aminé dans une protéine, on chercha à établir une relation entre la séquence linéaire des sites mutés d'un gène et la séquence linéaire des acides aminés de la protéine correspondante. (Il est possible de localiser les sites mutationnels dans un gène par des études de génétique fine que nous décrirons en détail plus loin dans ce chapitre.)

Charles Yanofsky examina la relation qui lie les gènes modifiés et les protéines altérées en étudiant la trytophane synthétase d'*E. coli*. Cette enzyme catalyse la conversion de l'indole glycérophosphate en tryptophane. Deux gènes, *trpA* et *trpB*, la déterminent. Chacun spécifie un polypeptide distinct ; après leur synthèse, les polypeptides A et B se combinent pour former l'enzyme active (une protéine multimérique). Yanofsky analysa des mutations du gène *trpA* qui provoquent des altérations de la sous-unité A de la tryptophane synthétase. Il détermina l'ordre des mutations par transduction à l'aide du phage P1 (voir à la page 298) afin d'établir une carte détaillée du gène, et détermina aussi la séquence d'acides aminés de chaque tryptophane synthétase altérée. Ses résultats ressemblaient à ceux d'Ingram pour l'hémoglobine : chaque mutant possèdait un polypeptide défectueux auquel était associé une substitution spécifique d'un acide aminé à un endroit précis. Toutefois, Yanofsky réussit à établir une intéressante corrélation qu'Ingram n'avait pas pu obtenir en raison des limitations de son système. Il obtint une correspondance précise entre la séquence des sites mutés sur la carte du gène A et la localisation des substitutions d'acides aminés dans la chaîne polypeptidique A. Plus deux mutations étaient écartées l'une de l'autre en unités de distance, plus il y avait d'acides aminés entre les substitutions correspondantes dans la séquence du polypeptide (figure 12-16). Yanofsky avait donc démontré la **colinéarité** — c'est-à-dire la correspondance entre les séquences linéaires du gène et du polypeptide. La figure 12-17 montre l'ensemble de ces données.

Message La séquence linéaire des nucléotides d'un gène détermine la séquence linéaire des acides aminés d'une protéine.

La fonction des enzymes

Comment une simple substitution d'acide aminé, comme celle de l'hémoglobine dans l'anémie à cellules falciformes (figure 12-13), peut-elle avoir un effet aussi considérable sur la fonction d'une protéine et sur le phénotype d'un organisme ? Prenez les enzymes, par exemple. Elles accomplissent leur fonction catalytique en se saisissant des molécules de substrats et en les tordant ou en les pliant pour former ou pour rompre des liaisons chimiques. La figure 12-18 montre la carboxypeptidase, une enzyme digestive gastrique, dans sa forme relâchée initiale et après qu'elle ait lié une molécule de

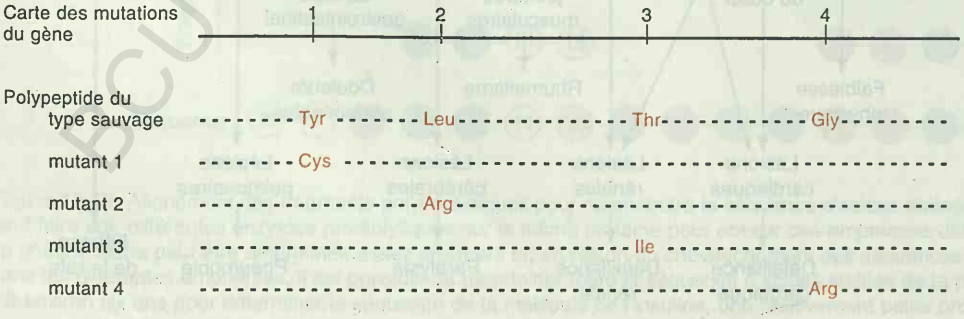


Figure 12-16. Représentation simplifiée de la colinéarité entre les mutations d'un gène et les substitutions d'acides aminés. La carte génétique des mutations ponctuelles (déterminées par l'analyse de recombinaison) correspond linéairement aux substitutions d'acides aminés dans les différents mutants (déterminées par l'analyse des empreintes digitales.)

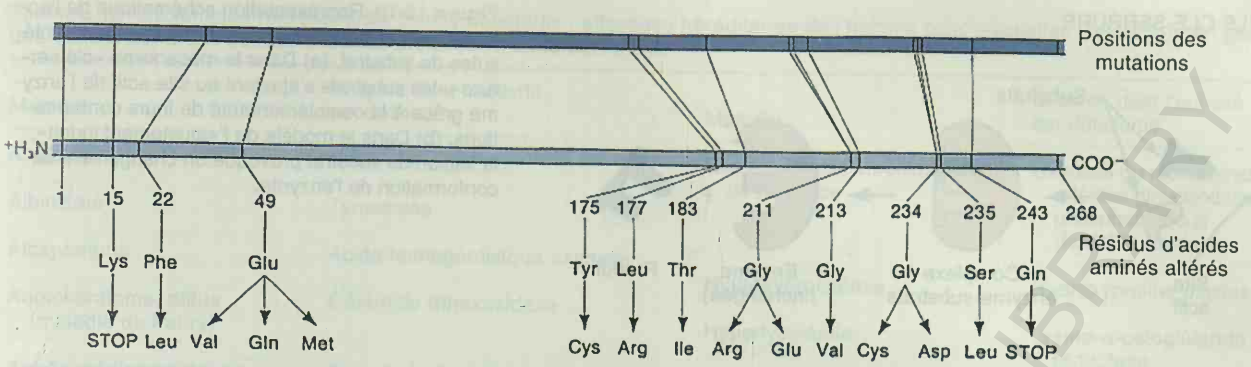


Figure 12-17. La colinéarité démontrée pour la protéine A de la tryptophane synthétase d'*E. coli.* Il existe une corrélation linéaire entre les sites mutationnels et les acides aminés modifiés. (Basé sur C. Yanofsky, «Gene Structure and Protein Structure». Copyright ©1967 by Scientific American. Tous droits réservés.)

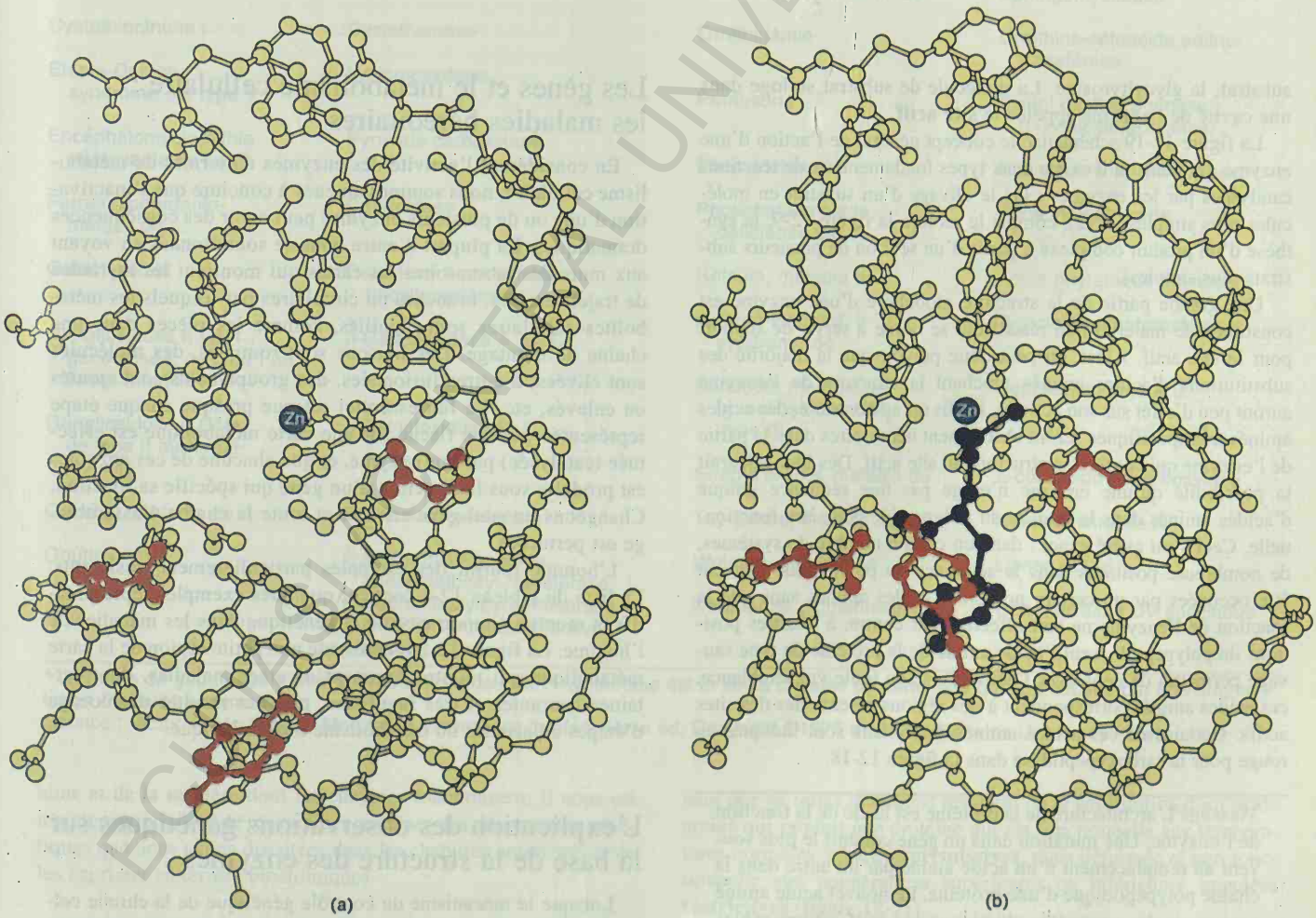


Figure 12-18. Le site actif de la carboxypeptidase, une enzyme digestive. (a) L'enzyme sans son substrat. (b) L'enzyme avec le substrat (en violet) en place dans le site actif. Trois acides aminés importants (en rouge) ont changé de position pour se rapprocher du substrat. La fonction de la carboxypeptidase est de cliver les protéines du régime alimentaire. (De W.N. Lipscomb, *Proceedings of the Robert A. Welch Foundation Conferences on Chemical Research* 15, 1971, 140-141.)

BCI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

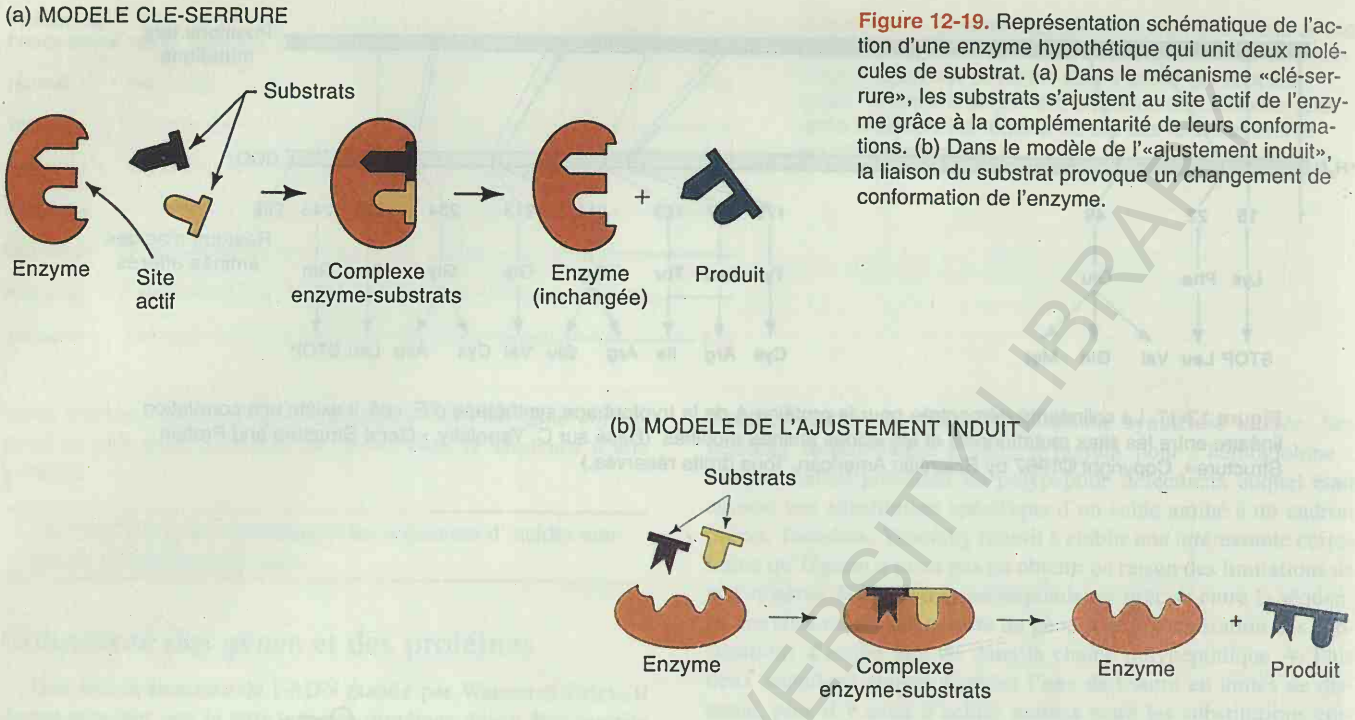


Figure 12-19. Représentation schématique de l'action d'une enzyme hypothétique qui unit deux molécules de substrat. (a) Dans le mécanisme «clé-serrure», les substrats s'ajustent au site actif de l'enzyme grâce à la complémentarité de leurs conformations. (b) Dans le modèle de l'«ajustement induit», la liaison du substrat provoque un changement de conformation de l'enzyme.

substrat, la glycyltyrosine. La molécule de substrat se loge dans une cavité de l'enzyme appelée le **site actif.**

La figure 12-19 schématise le concept général de l'action d'une enzyme. [Notons qu'il existe deux types fondamentaux de réactions catalysées par les enzymes : (1) le clivage d'un substrat en molécules plus simples, et (2), comme le montre la figure 12-9, la synthèse d'un produit complexe à partir d'un seul ou de plusieurs substrats plus simples].

Une grande partie de la structure globulaire d'une enzyme est constituée de matériel non réactif qui se borne à servir de support pour le site actif. Ainsi, on peut donc prévoir que la majorité des substitutions d'acides aminés touchant la structure de l'enzyme auront peu d'effet sur son activité, tandis qu'au contraire, des acides aminés très spécifiques seront absolument nécessaires dans la partie de l'enzyme qui confère sa structure au site actif. Dès lors, apparaît la possibilité qu'une enzyme n'exige pas une séquence unique d'acides aminés dans la *totalité* du polypeptide pour être fonctionnelle. Ceci s'est avéré exact : dans un certain nombre de systèmes, de nombreuse positions dans la séquence du polypeptide peuvent être occupées par un certain nombre d'acides aminés sans que la fonction de l'enzyme ne soit affectée. Par contre, à d'autres positions du polypeptide, seul l'acide aminé de la protéine de type sauvage permettra de conserver l'activité ; selon toute vraisemblance, ces acides aminés correspondent à des régions essentielles des sites actifs. Certains de ces acides aminés importants sont indiqués en rouge pour la carboxypeptidase dans la figure 12-18.

Message L'architecture de la protéine est la clé de la fonction de l'enzyme. Une mutation dans un gène conduit le plus souvent au remplacement d'un acide aminé par un autre dans la chaîne polypeptidique d'une protéine. Le nouvel acide aminé peut avoir des propriétés chimiques qui sont incompatibles avec l'architecture adéquate de la protéine à cette position particulière ; dans pareil cas, la mutation conduira à une protéine non fonctionnelle.

Les gènes et le métabolisme cellulaire : les maladies héréditaires

En considérant l'activité des enzymes en termes de métabolisme cellulaire, nous sommes amenés à conclure que l'inactivation d'une ou de plusieurs enzymes peut avoir des conséquences dramatiques. La plupart d'entre nous se sont étonnés en voyant aux murs des laboratoires les cartes qui montrent les myriades de trajets croisés, branchés ou circulaires par lesquels les métabolites cellulaires sont aiguillés, comme les pièces dans une chaîne de montage. Des liaisons sont rompues, des molécules sont clivées, d'autres fusionnées, des groupements sont ajoutés ou enlevés, etc. Le fait essentiel est que presque chaque étape représentée par une flèche sur une carte métabolique est effectuée (catalysée) par une enzyme, et que chacune de ces enzymes est produite sous la direction d'un gène qui spécifie sa fonction. Changeons un seul gène critique et toute la chaîne d'assemblage est perturbée.

L'homme fournit des exemples particulièrement saisissants. La liste du tableau 12-4 contient quelques exemples représentatifs et montre l'importance de la génétique dans les maladies de l'homme. La figure 12-20 représente une petite région de la carte métabolique qui montre comment diverses maladies, dont certaines courantes et très familières, peuvent résulter du blocage d'étapes adjacentes du métabolisme biosynthétique.

L'explication des observations génétiques sur la base de la structure des enzymes

Lorsque le mécanisme du contrôle génétique de la chimie cellulaire devint clair, diverses questions trouvèrent une réponse. De nombreuses observations qui avaient une portée générale en génétique pouvaient maintenant être organisées en un modèle conceptuel unique. Armés de la compréhension de la relation gène — pro-

Tableau 12-4. Exemples représentatifs d'enzymopathies : affections héréditaires de l'homme pour lesquelles l'altération (en général une déficience) d'une activité enzymatique précise a été démontrée

Maladie	Enzyme dont l'activité est déficiente*	Maladie	Enzyme dont l'activité est déficiente*
Acatalasie	Catalase	Granulomatose chronique de l'enfance	Oxydase du nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH oxydase)
Albinisme	Tyrosinase	Hydroxyprolinémie	Hydroxyproline oxydase
Alcaptonurie	Acide homogentisique oxydase	Hyperlysinémie	Lysine-α-cétoglutarate réductase
Angiokératome, diffus (maladie de Fabry)	Céramide trihexosidase	Hypoaldostéronisme congénital	18-OH-déshydrogénase
Apnée médicamenteuse	Pseudocholinestérase	Hypophosphatasie	Phosphatase alcaline
Argininémie	Arginase	Immunodéficience	Adénosine désaminase Uridine monophosphate kinase
Argininosuccinique, acidurie	Argininosuccinase	Krabbe, maladie de	Galactosylcéramide β-Galactosidase A
Ataxie intermittente	Pyruvate décarboxylase	Nieman-Pick, maladie de	Sphingomyélinase
Citrullinémie	Acide argininosuccinique synthétase	Ornithinémie	Ornithine-cétoacide amino-transférase
Crigler-Najjar, syndrome de	Glucuronyltransférase	Pentosurie	Xylitol déshydrogénase (L-xylulose réductase)
Cystathioninurie	Cystathionase	Phénylcétonurie	Phénylalanine hydroxylase
Ehlers-Danlos, syndrome de, type V	Lysine oxydase	Phosphatase acide, déficience de	Phosphatase acide
Encéphalomyélopathie nécrosante de Leigh	Pyruvate carboxylase	Refsum, maladie de	Acide phytanique oxydase
Farber, lipogranulo-matose de	Céramidase	Rickner-Hanhart, syndrome de	Tyrosine aminotransférase
Galactosémie	Galactose 1-phosphate uridyltransférase	Sandhoff, maladie de (gangliosidose GM_2, type II)	Hexosaminidase A,B
Gangliosidose à GM1 ; généralisée, de type I ou forme infantile	β-Galactosidase A, B, C	Sirop d'érable, maladie du	α-cétoacide décarboxylase
Gangliosidose à GM1 ; de type II ou forme juvénile	β-Galactosidase B, C	Tay-Sachs, maladie de	Hexosaminidase A
Gaucher, maladie de	Glucocérébrosidase	Wolman, maladie de	Lipase acide
Goutte	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase Phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) synthétase (activité accrue)	Xeroderma pigmentosum	Endonucléase UV spécifique

* La forme de goutte liée à une activité accrue de PRPP synthétase est la seule maladie de cette liste qui soit causée par une augmentation d'activité enzymatique.

SOURCE : Victor A. Mc Kusick, *Mendelian Inheritance in Man*, 4ème éd. Copyright ©1975 by Johns Hopkins University Press.

téine et de la manière dont les enzymes fonctionnent, il nous est maintenant possible de réexaminer certaines des découvertes génétiques que nous avons discutées dans les chapitres antérieurs et de les exprimer en termes biochimiques.

Allèles sensibles à la température. Souvenez-vous que certains mutants se comportent comme l'organisme sauvage à la température normale mais comme des mutants à des températures plus élevées ou plus faibles (voir à la page 184). Nous savons maintenant que de telles mutations résultent de la substitution d'un acide aminé qui produit une protéine qui est fonctionnelle aux températures normales, appelées **permissives,** mais déformée et non fonctionnelle aux températures supérieures ou inférieures, appelées **restrictives** (figure 12-21).

Comme nous l'avons vu, des mutations conditionnelles telles que les mutations thermosensibles peuvent être très utiles aux généticiens. Les cultures de mutants thermosensibles peuvent être maintenues aisément aux conditions permissives tandis que

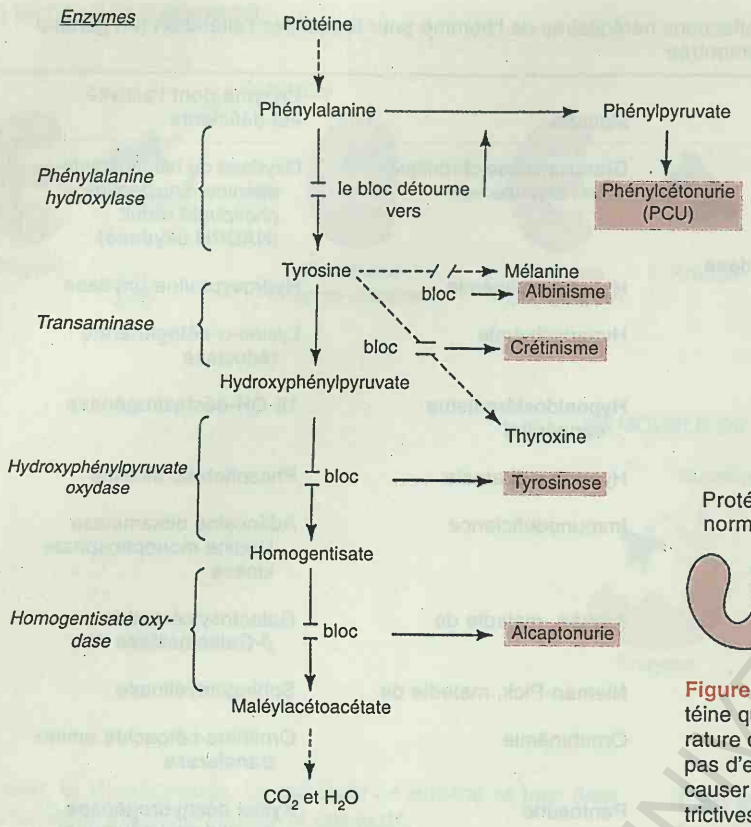


Figure 12-20. Une petite partie de la carte métabolique humaine montrant les conséquences de diverses déficiences enzymatiques spécifiques. (Les phénotypes correspondant à des maladies sont représentés par des rectangles colorés.) (D'après I. M. Lerner et W. J. Libby, *Heredity, Evolution and Society,* 2ième éd. Copyright ©1976 by W.H. Freeman and Company.)

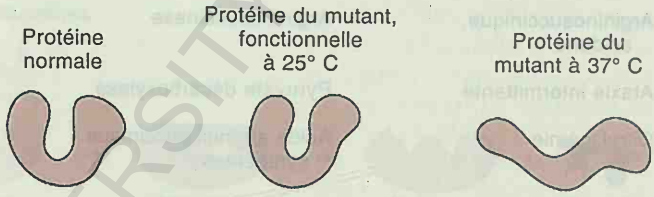


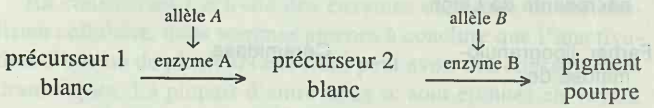
Figure 12-21. Schéma de la distorsion conformationnelle d'une protéine qui est probablement le fondement de la sensibilité à la température de certains mutants. Une substitution d'acide aminé qui n'a pas d'effet significatif aux températures normales (permissives) peut causer une distorsion appréciable aux températures anormales (restrictives).

leurs phénotypes mutés peuvent être étudiés de manière approfondie aux conditions restrictives. Ces mutants sont précieux pour la dissection génétique des systèmes biologiques. On peut par exemple transférer à une température restrictive un organisme porteur d'un allèle thermosensible ayant atteint différents stades de son développement et déterminer ainsi quand le gène correspondant est actif.

Les rapports génétiques. La plupart des rapports d'interaction génique «classiques» (mendéliens) peuvent être expliqués simplement par le concept un gène — une enzyme. Souvenez-vous par exemple du rapport dihybride 9 : 7 F_2 des pigments de fleurs de pois (voir à la page 103) :

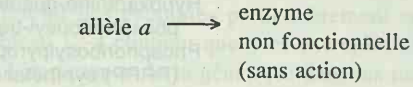
P	*AA bb* (blanc) × *aa BB* (blanc)	
	↓	
F_1	toutes *Aa Bb*	(pourpre)
	↓	
F_2	9 *A – B –*	(pourpre)
	3 *A – bb*	(blanc)
	3 *aa B –*	(blanc)
	1 *aa bb*	(blanc)

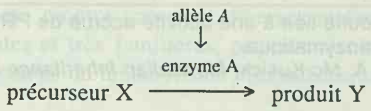
Nous pouvons facilement expliquer ce résultat en imaginant une voie biosynthétique qui comporte deux précurseurs incolores (blancs) et conduit à un pigment de couleur pourpre :



(Pourriez-vous établir vos propres modèles pour expliquer des rapports comme 9 : 3 : 4 et 13 : 3 ?)

Dominance et récessivité. Les notions de dominance et de récessivité deviennent également plus claires à la lumière du modèle biochimique. Dans la plupart des cas, la dominance représente la présence d'une fonction enzymatique, alors que la récessivité correspond à son absence. Un hétérozygote comporte un allèle dominant qui peut produire l'enzyme fonctionnelle :





Si le phénotype Y est dû à la présence du produit Y et le phénotype X à l'absence du produit Y, il est clair que l'hétérozygote aura le phénotype Y et que l'allèle *A* sera dominant par rapport à l'allèle *a*.

Néanmoins, ceci n'est pas le seul modèle possible. Nous pouvons dans un modèle de ce genre introduire le concept de seuil. Supposons que le phénotype Y s'exprime seulement lorsque la

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

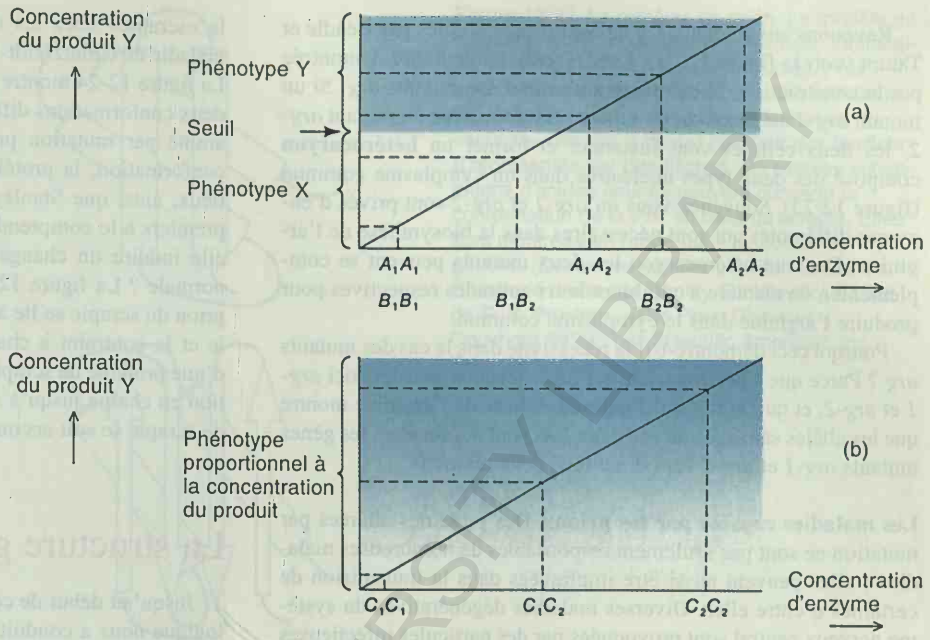


Figure 12-22. Courbes imaginaires rapportant la concentration d'enzyme à la quantité de produit. Fondamentalement, deux situations sont possibles. En (a), un seuil de concentration du produit de l'enzyme existe au-delà duquel un phénotype nettement différent, Y, est observé. Selon les niveaux auxquels se situent les trois génotypes possibles par rapport au niveau de seuil, les hétérozygotes présenteront un phénotype X (par exemple, B_1B_2) ou Y (par exemple A_1A_2). Si c'est l'allèle 2 qui est actif, on peut voir que l'allèle actif (A_2) peut être dominant, ce qui est normalement le cas. Moins fréquemment, l'allèle inactif (B_1) peut être dominant. En (b), il n'a y pas de seuil, et l'hétérozygote montre un phénotype intermédiaire. Cette situation explique la dominance incomplète.

concentration du produit Y dépasse un certain seuil. Supposons en outre que l'homozygote *AA* fournit plus d'enzyme — et donc, plus de produit — que l'hétérozygote *Aa*. Dans ce cas, le phénotype de l'hétérozygote dépendra de la relation existant entre le seuil et la quantité de produit Y formé par l'hétérozygote. Dans la figure 12-22a, l'hétérozygote A_1A_2 fournit assez de produit Y pour dépasser le seuil, de sorte que l'hétérozygote a le phénotype Y et que A_2 est dominant sur A_1. Mais la situation pourrait aussi être celle montrée pour les allèles B_1 et B_2 où l'hétérozygote B_1B_2 n'atteint pas le seuil. Dans ce cas (qui est moins fréquent), B_1 est dominant sur B_2 et le phénotype dominant est celui qui entraîne une carence en produit Y.

La figure 12-22b illustre le cas où il n'y a pas d'effet de seuil. L'hétérozygote a un phénotype intermédiaire — c'est-à-dire la situation observée dans les cas de dominance incomplète.

Qu'est-ce qui détermine si un gène se comportera comme *A*, *B* ou *C* ? De nombreux facteurs interagissent probablement à ce niveau : l'action d'autres gènes, la nature chimique du produit et, surtout, l'effet de l'environnement sur ce type cellulaire particulier. Enfin, notez que la figure 12-22 illustre le cas d'une relation linéaire simple entre la concentration de l'enzyme et le nombre d'allèles actifs — mais ceci n'est pas nécessairement le cas, comme nous le verrons au chapitre 18.

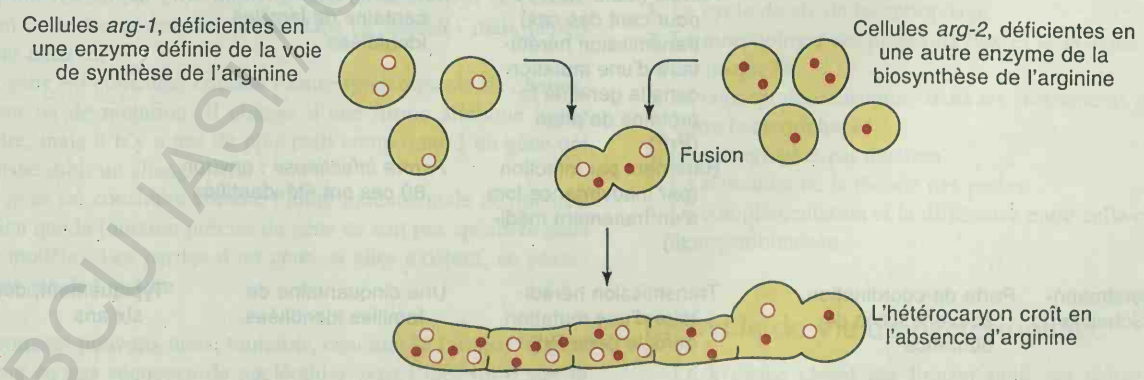


Figure 12-23. Formation chez *Neurospora* d'un hétérocaryon démontrant la complémentation et la récessivité. Les cellules végétatives de ce champignon qui est normalement haploïde peuvent fusionner, permettant aux noyaux des deux souches de se mélanger dans le même cytoplasme. Si chaque souche est bloquée à une étape différente de la voie, comme *arg-1* et *arg-2*, toutes les fonctions sont présentes dans l'hétérocaryon et la moisissure se développera ; en d'autres termes, il y a complémentation. La croissance exige la présence des allèles sauvages ; les gènes mutés *arg-1* et *arg-2* sont donc récessifs.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Revenons aux mutants *arg* de Neurospora étudiés par Beadle et Tatum (voir la figure 12-23). Leur récessivité peut être démontrée par la construction d'hétérocaryons entre deux mutants *arg*. Si un mutant *arg-1* est placé sur un milieu minimum avec un mutant *arg-2*, les deux cellules vont fusionner et former un **hétérocaryon** composé des deux types nucléaires dans un cytoplasme commun (figure 12-23). Souvenez-vous qu'*arg-1* et *arg-2* sont privés d'enzymes différentes qui sont nécessaires dans la biosynthèse de l'arginine. Dans un hétérocaryon les deux mutants peuvent se complémenter, de manière à combiner leurs aptitudes respectives pour produire l'arginine dans le cytoplasme commun.

Pourqoi ceci démontre-t-il la récessivité dans le cas des mutants *arg* ? Parce que l'hétérocaryon est hétérozygote pour les loci *arg-1* et *arg-2*, et que le fait qu'il puisse produire de l'arginine montre que les allèles sauvages de ces deux loci sont dominants ; les gènes mutants *arg-1* et *arg-2* sont donc tous deux récessifs.

Les maladies causées par les prions. Des protéines altérées par mutation ne sont pas seulement responsables de nombreuses maladies ; elles peuvent aussi être impliquées dans la transmision de certaines d'entre elles. Diverses maladies dégénératives du système nerveux central sont provoquées par des particules infectieuses de nature protéique, les **prions**. Ce sont les prions qui provoquent le «scrapie» chez les moutons et les chèvres et, notamment, la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme (voir le tableau 12-5). La figure 12-24 montre une protéine de prion qui peut exister sous deux conformations différentes. Lorsque la substitution d'un acide aminé par mutation provoque un changement spécifique de sa conformation, la protéine de prion peut devenir un agent infectieux, ainsi que Stanley Prusiner et ses collaborateurs furent les premiers à le comprendre. Comment une protéine anormale peut-elle induire un changement de conformation chez une protéine normale ? La figure 12-25 montre un schéma où une protéine de prion du scrapie se lie à une molécule de protéine de prion normale et la contraint à changer de conformation pour acquérir celle d'une protéine de scrapie. Ce processus se répète comme une réaction en chaîne jusqu'à ce que suffisamment de protéines de prion de scrapie se soit accumulées pour provoquer des effets toxiques.

La structure génétique fine

Jusqu'au début de ce chapitre, notre analyse génétique et cytologique nous a conduit à regarder le chromosome comme un alignement (unidimensionel) de gènes, ressemblant à l'enchaînement

Tableau 12-5. Les maladies de l'homme causées par des prions

Maladie	Symptômes typiques	Modes d'acquisition	Distribution	Durée de vie après l'apparition de la maladie
Kuru	Perte de coordination, souvent suivie de démence	Infection (sans doute par le cannibalisme arrêté en 1958)	Connue seulement en Nouvelle Guinée ; 2.600 cas identifiés en 1957	Trois mois à un an
Maladie de Creutzfeldt-Jakob	Démence, suivie de perte de coordination, ordre qui est parfois inversé	En général inconnu (pour la maladie sporadique) Parfois (dans 10 à 15 pour cent des cas) transmission héréditaire d'une mutation dans le gène de la protéine de prion (PrP) Rarement par infection (par inadvertance lors d'un traitement médical)	*Forme sporadique :* une personne par milllion dans le monde *Forme héréditaire* : une centaine de familles identifiées *Forme infectieuse :* environ 80 cas ont été identifiés	Typiquement, environ un an ; compris entre un mois et plus de dix ans
Maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker	Perte de coordination, souvent suivie de démence	Transmission héréditaire d'une mutation dans le gène PrP	Une cinquantaine de familles identifiées	Typiquement, deux à six ans
Insomnie familiale fatale	Troubles du sommeil et du système nerveux autonome, suivis d'insomnie et de démence	Transmission héréditaire d'une mutation dans le gène PrP	Neuf familles identifiées	Typiquement environ un an

SOURCE : S. B. Prusiner, «The Prion Diseases.» Copyright © 1995 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

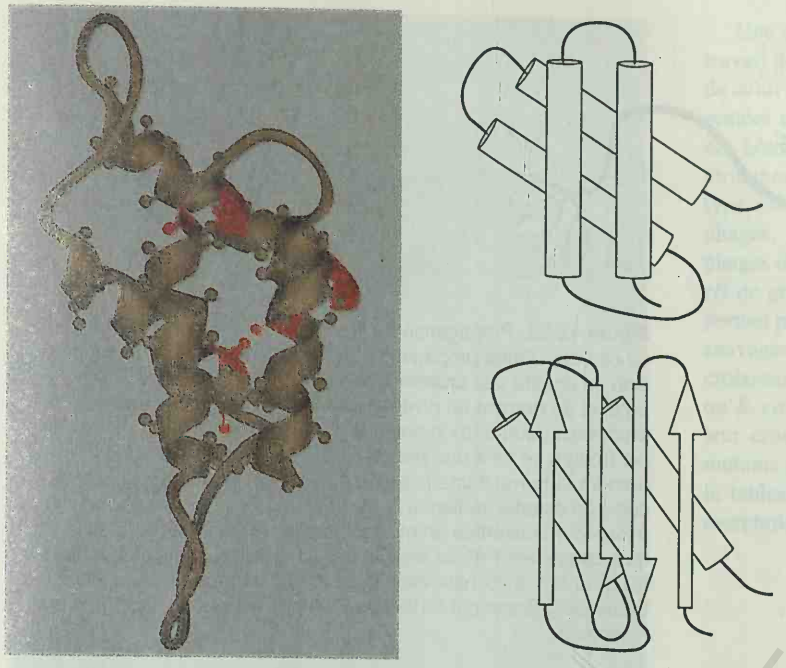


Figure 12-24. La protéine de prion. Le modèle de gauche montre la protéine PrP normale, inoffensive, et son squelette à hélices multiples. (Voir aussi le schéma supérieur droit où les cylindres représentent des hélices.) La conformation du «scrapie» (en bas à droite) possède des feuillets β représentés par des flèches. De simples substitutions d'acides aminés peuvent convertir la conformation de la PrP en celle du scrapie. Elles sont montrées en rouge dans le modèle de gauche. (Dessin de gauche par Fred E. Cohen. Dessin de droite par Dimitry Schidlovsky. Extrait de S. B. Prusiner, «The Prion Diseases». Copyright ©1995 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

des perles sur le fil d'un collier. Ce modèle est d'ailleurs appelé parfois la **théorie des perles** («bead theory»). Selon cette théorie, l'existence d'un gène en tant qu'unité de transmission héréditaire est reconnue grâce à l'existence de ses allèles mutés. Tous ces allèles affectent un même caractère phénotypique, tous sont localisés au même locus chromosomique, tous fournissent un phénotype mutant lorsqu'ils sont combinés et tous, enfin, montrent des rapports mendéliens lorsqu'ils sont croisés. Plusieurs points de cette théorie des perles méritent d'être soulignés :

1. Le gène est considéré comme l'unité de *structure* fondamentale, indivisible par crossing-over. Les crossing-over se produisent entre les gènes (les perles dans ce modèle) mais jamais dans ceux-ci.
2. Le gène est considéré comme l'unité fondamentale de *changement* ou de mutation. Il change d'une forme allélique à une autre, mais il n'y a pas de plus petit composant d'un gène qui puisse subir un changement.
3. Le gène est considéré comme l'unité fondamentale de *fonction* (bien que la fonction précise du gène ne soit pas spécifiée dans ce modèle). Les parties d'un gène, si elles existent, ne possèdent pas de fonction.

Comment pouvons-nous, toutefois, concilier le fait que le gène consiste en une séquence de nucléotides avec l'idée qu'il soit la plus petite unité de mutation ou de recombinaison ? Les travaux de Seymour Benzer, dans le courant des années cinquante, ont montré que la théorie des perles n'est pas correcte. Pour cela, Benzer a utilisé un système génétique qui permet de détecter des niveaux de recombinaison extrêmement faibles. Il a démontré que, si le gène peut être défini comme une unité de fonction, il peut néanmoins être subdivisé en un alignement de sites qui peuvent être mutés et subir la recombinaison. On sait maintenant que les plus petites unités de mutation et de recombinaison correspondent aux paires de bases.

L'analyse de la structure fine du gène

Comme nous le verrons, l'analyse, aujourd'hui classique, de la structure fine d'un gène par Benzer comportait les points suivants :

1. Le cycle de vie du bactériophage.
2. La morphologie des plages de lyse et le système *rII* du phage T4.
3. Le concept de «sélection» dans les croisements génétiques entre bactériophages.
4. La cartographie par délétion.
5. La réfutation de la théorie des perles.
6. La complémentation et la différence entre celle-ci et la recombinaison.

Le cycle de vie du bactériophage

Le système choisi par Benzer pour ses études génétiques à haute résolution est le génome du bactériophage. C'est pourquoi ce travail sera beaucoup plus facile à expliquer si nous commençons par passer en revue la matière couverte par les pages 291 à 294. Résumons en les points essentiels. Rappelez-vous que les bactériophages sont des virus qui attaquent les bactéries. (L'espèce

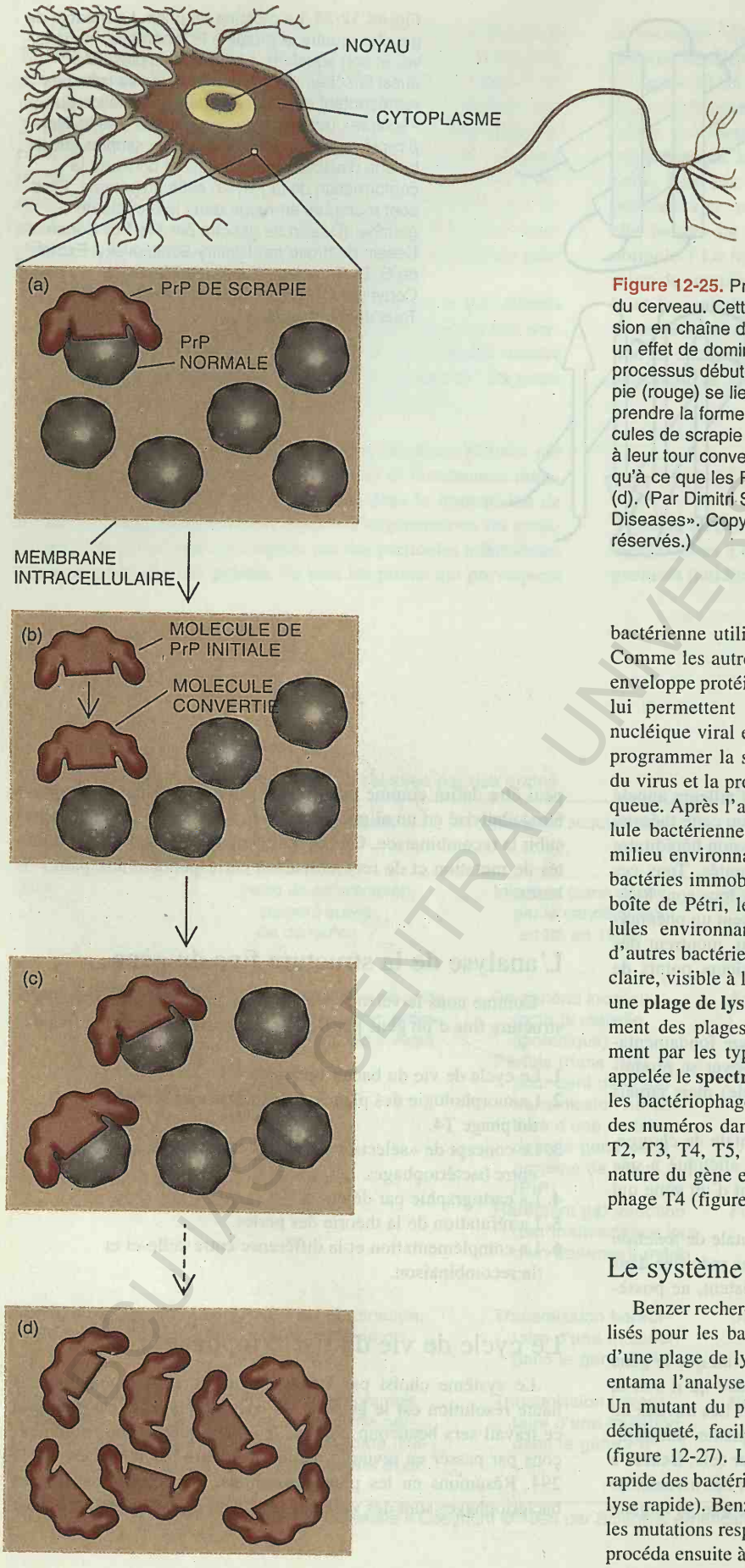


Figure 12-25. Propagation de la PrP de scrapie dans les neurones du cerveau. Cette propagation implique probablement une conversion en chaîne des protéines normales en protéines de scrapie par un effet de domino au niveau d'une membrane intracellulaire. Le processus débute (a) lorsqu'une première molécule de PrP de scrapie (rouge) se lie à une protéine normale (brune) et l'induit à prendre la forme d'une protéine de scrapie (b). Ensuite, les molécules de scrapie se lient à d'autres molécules normales (c) qui sont à leur tour converties en molécules de scrapie et ainsi de suite jusqu'à ce que les PrP de scrapie s'accumulent à un niveau dangereux (d). (Par Dimitri Schidlovsky. D'après S. B. Prusiner, «The Prion Diseases». Copyright ©1995 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

bactérienne utilisée le plus souvent pour ces études est *E. coli*.). Comme les autres virus, un phage consiste habituellement en une enveloppe protéique contenant l'ADN et en des fibres caudales qui lui permettent de s'attacher à la paroi bactérienne. L'acide nucléique viral est injecté dans la cellule ; ceci a pour résultat de programmer la synthèse de protéines qui stimulent la réplication du virus et la production de nouvelles protéines d'enveloppe et de queue. Après l'assemblage des nouvelles particules virales, la cellule bactérienne est lysée et les particules sont libérées dans le milieu environnant. Si la cellule infectée fait partie d'un tapis de bactéries immobilisées à la surface de la gélose (agar-agar) d'une boîte de Pétri, les nouveaux phages formés vont infecter les cellules environnantes, et leur descendance à son tour infectera d'autres bactéries proches, et ainsi de suite jusqu'à ce qu'une zone claire, visible à l'œil nu, soit formée. Cette zone claire est appelée une **plage de lyse** (voir la figure 10-21). Des phages différents forment des plages d'aspects distincts. Les phages diffèrent également par les types de cellules qu'ils infectent — une propriété appelée le **spectre d'hôtes** («host range»). Initialement, on classait les bactériophages selon leurs spectres d'hôtes et on leur donnait des numéros dans la série «T». On a par exemple les phages T1, T2, T3, T4, T5, etc. Beaucoup des expériences qui concernent la nature du gène et le code génétique furent réalisées au moyen du phage T4 (figure 12-26).

Le système *rII*

Benzer rechercha des marqueurs génétiques qui puissent être utilisés pour les bactériophages. Il comprit que la taille et la forme d'une plage de lyse sont des caractères transmissibles et dès lors il entama l'analyse génétique de la morphologie des plages de lyse. Un mutant du phage T4 produisait de grandes plages à l'aspect déchiqueté, faciles à distinguer de celles d'une souche sauvage (figure 12-27). La grande taille de ces plages provient de la lyse rapide des bactéries et ces mutants sont appelés des **mutants *r*** (pour lyse rapide). Benzer fit l'analyse génétique des mutants *r* et localisa les mutations responsables du phénotype *r* en deux loci : *rI* et *rII*. Il procéda ensuite à une étude approfondie des mutants *rII*.

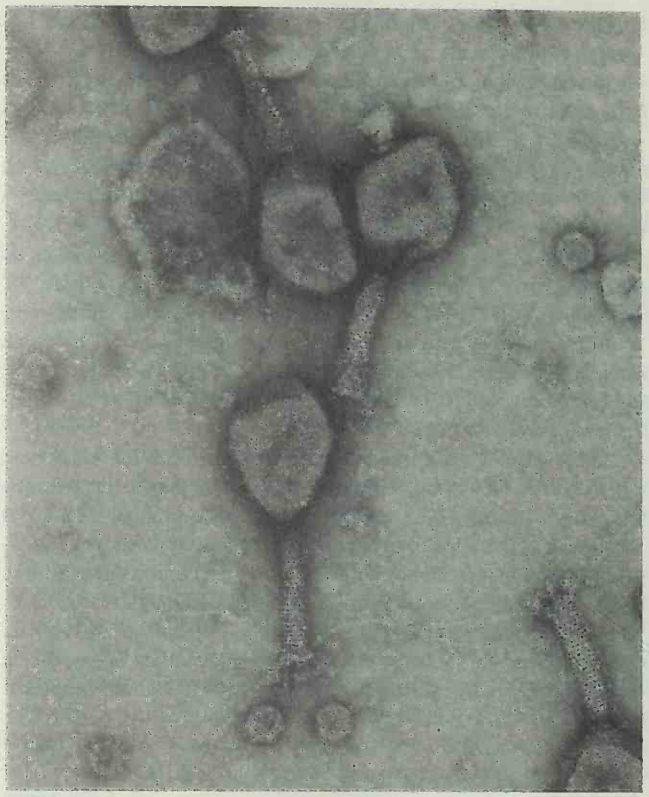


Figure 12-26. Agrandissement du phage T4 d'*E. coli* montrant les détails de sa structure : notez la tête, la queue et les fibres de la queue. C'est le phage utilisé par Benzer dans ses expériences sur la nature du gène *rII* (lyse rapide). (Photographie due à l'amabilité de Jack D. Griffith.)

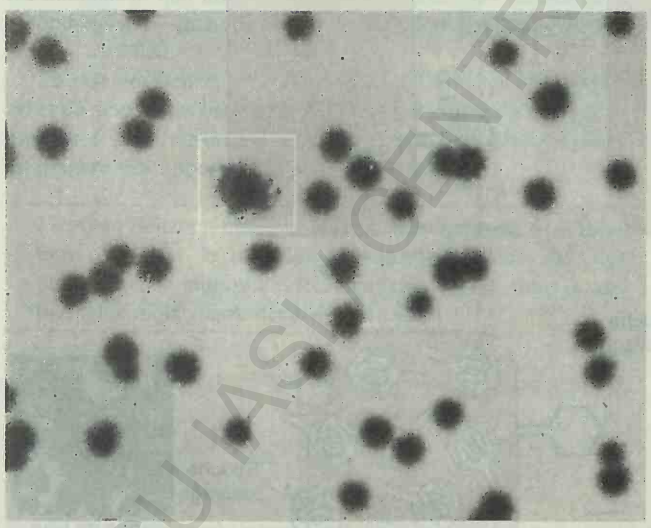


Figure 12-27. Un événement mutationnel spontané est révélé par une plage de lyse mouchetée (*entourée par un carré*) présente parmi les nombreuses plages normales (sauvages) formées lorsqu'un phage T4 est étalé sur un tapis d'*E. coli* B. Chaque plage de lyse contient environ 10 millions de phages qui descendent d'une seule particule initiale. La plage elle-même est une région où les cellules bactériennes ont été détruites. Les mutants présents dans les plages anormales constituent la matière première de l'analyse génétique (Extrait de S. Benzer «The Fine Structure of the Gene». Copyright ©1962 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

Une remarquable propriété de ces mutants *rII* rendit possible le travail de Benzer : le spectre d'hôtes de ces mutants était différent de celui des phages de type sauvage. Deux souches d'*E. coli* apparentées mais distinctes, appelées B et K(λ), se comportent comme des hôtes différents vis-à-vis du phage T4. Ces deux souches bactériennes permettent de distinguer les mutants *rII* des phages de type sauvage. *E. coli* B permet la croissance des deux types de phages, mais avec des dimensions de plages différentes : les phages de type sauvage produisent de petites plages et les mutants *rII* de grandes plages. *E. coli* K, l'abréviation de *E. coli* K(λ), ne permet pas la croissance des mutants *rII* mais bien celle des phages sauvages. Les mutants *rII* sont des **mutants conditionnels** qui croissent dans certaines conditions mais pas dans d'autres. On dit qu'*E. coli* B est **permissif** pour les mutants *rII,* parce qu'il permet leur croissance, tandis qu'*E.coli* K est **non permissif** pour ces mutants puisqu'il ne permet pas leur croissance. La figure 12-28 et le tableau 12-6 montrent les caractéristiques de croissance et la morphologie des plages pour chacune des souches bactériennes.

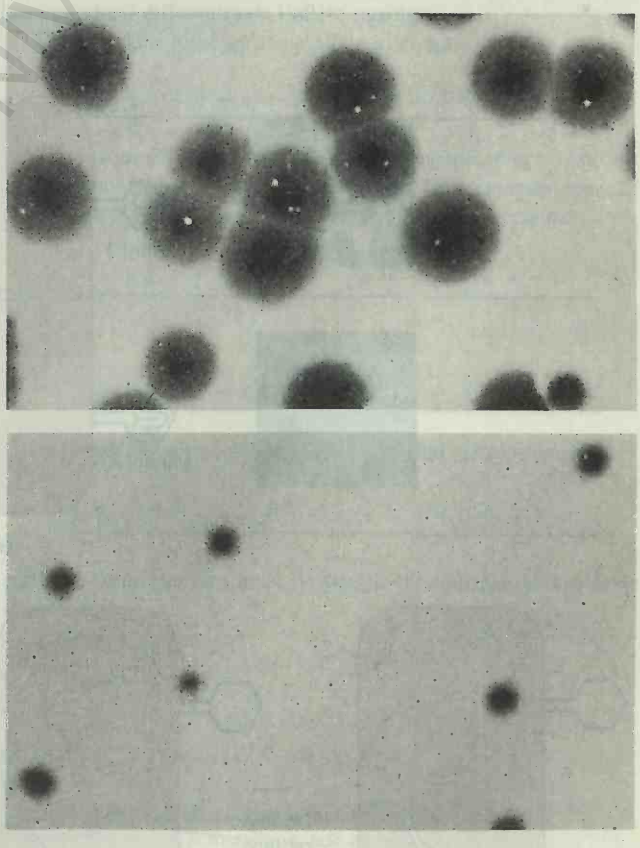


Figure 12-28. Les répliques d'une population mixte de phages provenant d'une plage mouchetée comme celle montrée dans la figure 12-27, fournissent des résultats différents selon la bactérie hôte. S'ils sont répliqués sur la souche B d'*E. coli* (à gauche), les mutants *rII* produisent de grandes plages. Si la même population mixte est étalée sur la souche K (en bas), seuls les phages sauvages donnent des plages. (Extrait de S. Benzer «The Fine Structure of the Gene». Copyright ©1962 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

Tableau 12-6. Phénotypes des plages de lyse produites par différentes combinaisons de souches *d'E. coli* et de phages

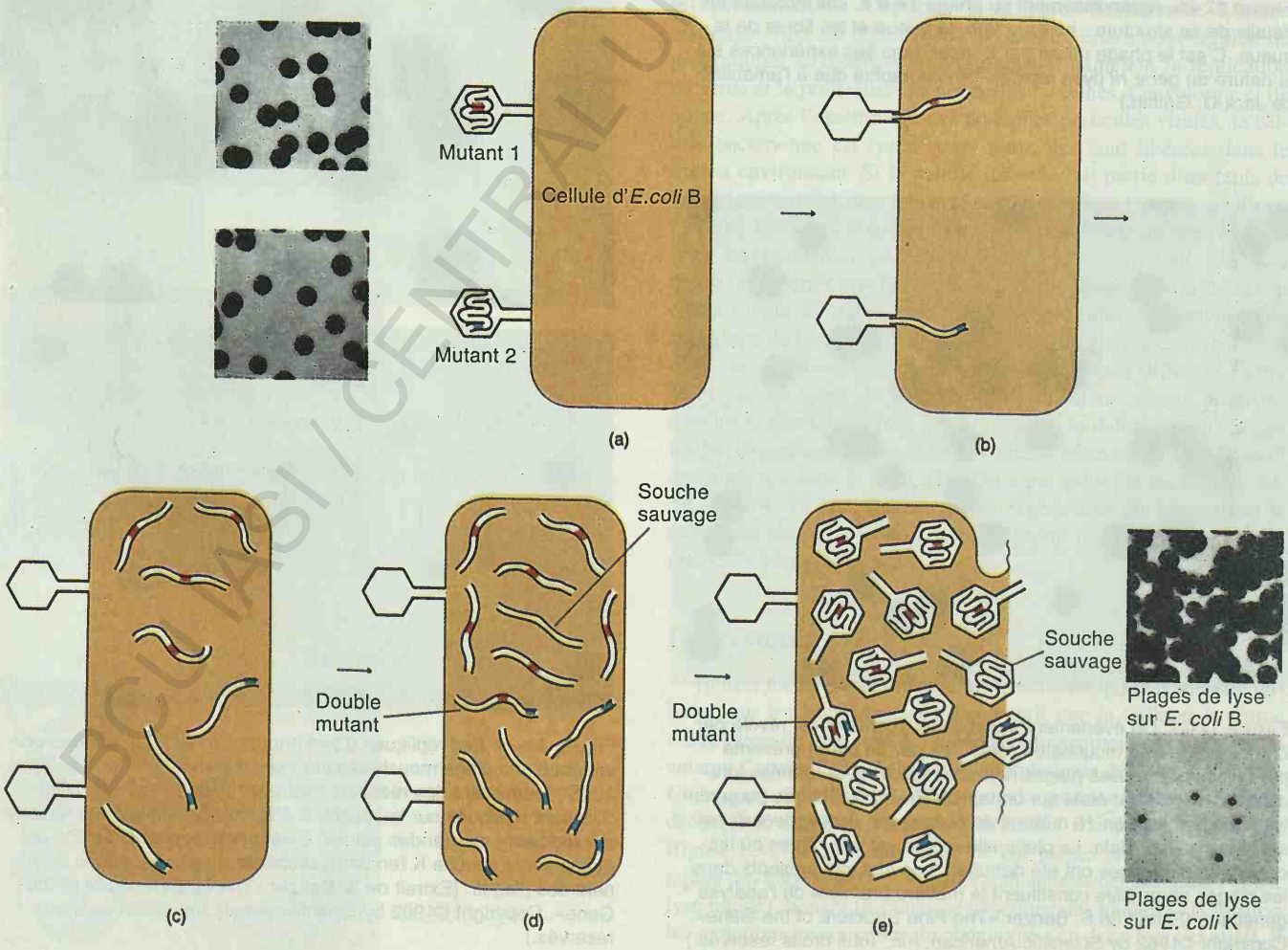
Souches de phage T4	Souches d'*E. coli* B	Souches d'*E. coli* K
rII	Grandes, rondes	Pas de plages
rII$^+$	Petites, mouchetées	Petites, mouchetées

La sélection dans les croisements entre bactériophages

Benzer croisa divers mutants *rII* du phage T4 et obtint des fréquences de recombinaison qu'il utilisa ensuite pour localiser les mutations dans la région *rII*. Comment réaliser des croisements entre phages différents ? Pour faire cela, il faut infecter la même cellule bactérienne au moyen de deux phages de types différents, comme nous le décrivons à la page 293. A condition que le rapport entre les nombres de phages et de bactéries soient suffisamment élevé, pratiquement chaque bactérie sera infectée par au moins un phage de chaque type. Une fois dans la cellule, les ADN des deux phages T4 ont la possibilité de se recombiner en produisant des phages recombinants qui sont recouvrés parmi les descendants.

Voyons comment cela se passe. Supposons que nous désirions croiser entre eux deux mutants rII et recouvrer des recombinants sauvages. Etant donné que les phages de type sauvage et les mutants *rII* forment des plages qui peuvent être distinguées les unes des autres, nous pouvons croiser deux mutants *rII* et étaler la descendance obtenue sur *E. coli* B (figure 12-29, en bas à droite, photographie supérieure), en espérant trouver de petites plages de lyse de type sauvage parmi les grandes plages des mutants *rII parentaux*. Si la fréquence de recombinaison est assez élevée pour fournir 2 à 3 pour cent de plages de lyse sauvages, cette méthode peut suffire. Mais si la fréquence de recombinaison est inférieure à 1 pour cent, établir la carte de nombreuses mutations *rII* représente un travail énorme.

Au lieu d'étaler la descendance des phages issus du croisement sur *E. coli* B, nous pouvons étaler cette descendance sur un tapis d'*E. coli* K (figure 12-29, en bas à droite, photographie inférieure) de sorte que seuls les phages recombinants de type sauvage puissent se développer. Même si la fréquence de recombinaison est très faible (par exemple, 0,01 pour cent), nous pouvons détecter aisément les phages recombinants. Pourquoi ? Parce qu'un lysat de phage typique (le mélange de phages produit après la lyse de la bactérie) qui résulte d'une infection de ce type (qu'elle implique



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

un croisement ou pas) contient plus de 10^9 phages par millilitre (ml). En mélangeant 0,1 ml de ce lysat avec 0,1 ml d'une suspension d'*E. coli* K, nous obtiendrons au moins 10^5 (100.000) recombinants sauvages parmi les phages infectant ces bactéries, ceci pour une fréquence de recombinaison de 0,01 pour cent. (En pratique, on utilise des dilutions croissantes du lysat de phage jusqu'à ce qu'on trouve celle qui fournit un nombre de plages par boîte qui puisse être compté). Ainsi nous voyons la puissance du système *rII* —*E. coli* B / K de Benzer. Dans un millilitre de lysat, on peut trouver un phage recombinant ou révertant parmi 10^9 organismes. Comparez ceci avec la recherche d'un recombinant parmi 10^9 drosophiles ou 10^9 souris !

Une fois que nous avons fait notre croisement, nous devons déterminer la fréquence de recombinaison. Tout d'abord nous comptons le nombre de particules de virus actives c'est-à-dire d'unités capables de former une plage de lyse (**ufp**) qui se développent sur *E. coli* K (celles ci, rappelons-le, ne sont que des recombinants de type sauvage) et sur *E. coli* B (ceci représente le nombre total de phages formés puisque tous peuvent se développer sur la souche B). La fréquence des recombinants peut être calculée en divisant deux fois le nombre d'ufp sur *E. coli* K par le nombre d'ufp sur *E. coli* B. Pourquoi utilisons-nous deux fois la fréquence des ufp pour *E.coli* K ? Pour tenir compte des recombinants qui sont des doubles mutants et ne peuvent pas être détectés ; de tels mutants devraient être présents à la même fréquence que les recombinants sauvages. Les figures 12-29 et 12-30 montrent des représentations schématiques de ces principes.

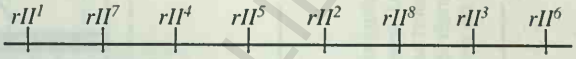
Enfin, il est nécessaire pour chaque croisement de ce type d'étaler chacun des lysats parentaux sur *E. coli* K pour déterminer combien de révertants de type sauvage étaient présents dans cette population. **Les mutations réverses** apparaissent avec une fréquence très faible mais néanmoins significative. Il est important de mesurer cette fréquence et de la comparer avec la fréquence de recombinaison que nous avons calculée pour être certain qu'une recombinaison — et non une simple réversion vers les types parentaux — a eu lieu.

En résumé, Benzer s'est doté, grâce à l'utilisation du système *rII* et de deux hôtes bactériens différents, d'une méthodologie permettant de détecter un événement très rare sans devoir examiner un nombre très important de plages de lyse.

Message Benzer a misé sur le fantastique pouvoir de résolution offert par la sélection d'événements rares chez les phages, qui se multiplient très rapidement, pour faire la cartographie moléculaire détaillée d'un gène.

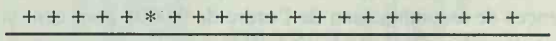
La recombinaison intragénique

Benzer partit d'un ensemble de huit souches mutantes *rII* obtenues de manières indépendantes, et les croisa deux à deux de toutes les manières possibles par la double infection d'*E. coli* B, suivie d'étalement sur un tapis d'*E. coli* K (figures 12-29 et 12-30). Utilisant les fréquences de recombinaison, il put localiser les mutations sans ambiguïté à la gauche ou à la droite les unes des autres pour établir ce que nous appelons maintenant une **carte génétique** (dans le cas présent, les unités cartographiques correspondent aux fréquences d'obtention des plages de type rII^{+}) :

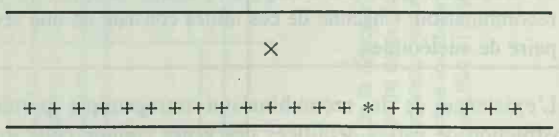


La recombinaison à l'intérieur d'un gène, appelée la **recombinaison intragénique,** semble la règle plutôt que l'exception. On peut pratiquement toujours l'observer, à n'importe quel locus, à condition de disposer d'un moyen de sélection efficace pour détecter les recombinants. En d'autres mots, un allèle muté peut être décrit comme un segment de matériel génétique (le gène) qui comporte une partie endommagée ou non sauvage — un **site mutationnel** — quelquepart. C'est cette lésion partielle qui fait que le phénotype n'est plus sauvage. Des allèles différents produisent des effets phénotypiques distincts parce qu'ils sont touchés dans des parties (sites) différentes de l'allèle sauvage.

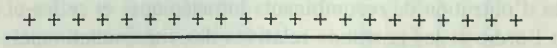
On peut donc représenter un allèle a^1 comme



où l'astérisque (*) est le site muté dans un gène qui, pour le reste, est normal (montré par les sites marqués de +). Un croisement entre a^1 et un autre allèle muté a^2, peut en général être représenté par



et il est aisé de voir comment un gène normal, de type sauvage



peut être formé par un simple crossing-over entre les deux sites de mutation.

Figure 12-29. (en face) Le processus de la recombinaison permet à des portions de l'ADN de deux phages mutants différents de s'assembler pour former une nouvelle molécule d'ADN qui peut comporter soit les deux mutations, soit aucune mutation. Les mutants obtenus à partir de deux cultures différentes sont introduits dans du bouillon contenant *E. coli* souche B. Le croisement a lieu (a) lorsque les ADN des deux types de mutants infectent la même bactérie. La plupart des répliques d'ADN sont de l'un ou de l'autre type, mais occasionnellement la recombinaison produira soit un double mutant, soit un recombinant sauvage ne contenant aucune mutation. Lorsque la descendance du croisement est étalée sur un tapis de la souche B, tous les recombinants ont la possibilité de croître en produisant de nombreuses plages de lyse. Mais après étalement sur un tapis de la souche K, seuls les recombinants sauvages ont la capacité de proliférer. Un seul recombinant sauvage peut être détecté parmi 100 millions de descendants. (Modifié d'après S. Benzer, «The Fine Structure of the Gene». Copyright ©1962 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

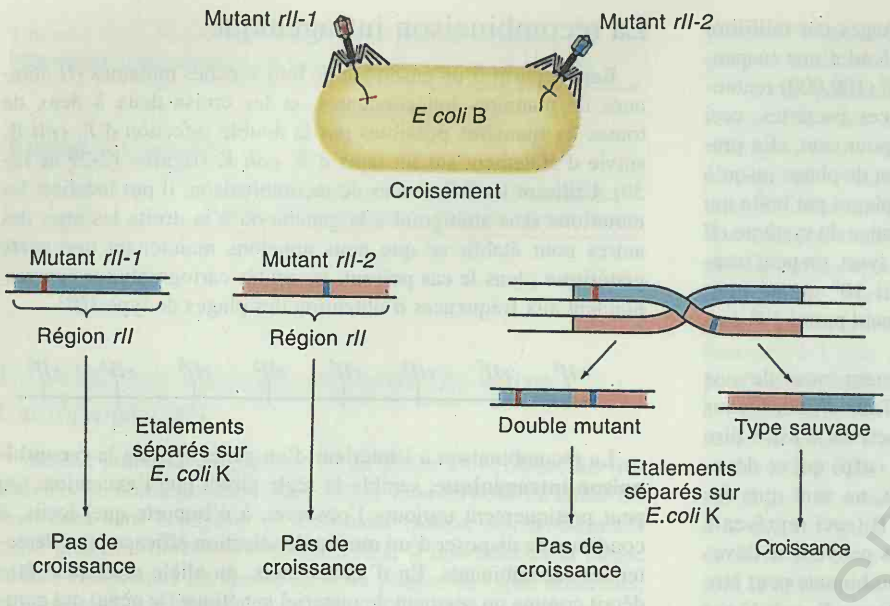


Figure 12-30. Sélection de recombinants intragéniques du locus *rII* du phage T4. Des mutants du locus *rII* ne peuvent pas se développer sur *E. coli* K. Lorsque deux phages différents portant des allèles différents du même gène *rII* infectent la même bactérie, certains phages de leur descendance sont capables de croître sur *E. coli* K ; en d'autre mots, une partie de la descendance est devenue *rII*$^+$. Ce résultat indique que la recombinaison peut se produire *dans* un gène et pas seulement entre gènes.

Benzer a montré que, contrairement à la manière de voir habituelle, les gènes ne sont pas indivisibles et peuvent être subdivisés grâce à la recombinaison. Etendant son analyse à des centaines d'allèles *rII*, il a constaté que la fréquence de recombinaison minimale entre deux allèles mutés différents est de 0,01 pour cent, alors que son outil analytique lui aurait permis de détecter des fréquences de recombinaison de l'ordre de 0,0001 pour cent si elles avaient eu lieu. Ceci conduisit à l'idée que les gènes sont composés de petites unités et que la recombinaison ne peut avoir lieu qu'entre et non dans ces unités. Nous savons maintenant que la paire de nucléotides est la plus petite unité de recombinaison.

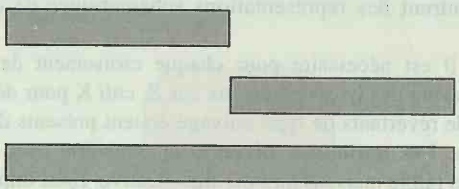
Message Un gène est composé d'unités indivisibles par recombinaison. Chacune de ces unités consiste en une seule paire de nucléotides.

L'existence de la recombinaison intragénique permet la construction de cartes détaillées des gènes comme celle qui est montrée dans la figure 12-31 pour la région *rII*. La réalisation de croisements entre divers mutants nous fournit les fréquences relatives d'obtention de recombinants intragéniques et celles-ci révèlent l'ordre et les positions relatives des sites mutationnels d'un gène. Il faut noter que le mécanisme de la recombinaison *dans* un gène est le même que celui de la recombinaison *entre* les gènes ; seule l'échelle est différente.

Les sites mutationnels

L'utilisation de délétions pour localiser les sites mutationnels

Benzer étendit son analyse de la structure fine des gènes à l'étude des propriétés des sites mutationnels. La **cartographie par délétion** est un outil très efficace pour ce genre d'étude. Les délétions sont des mutations qui résultent de l'élimination de segments d'ADN. Elles peuvent être recombinées et localisées exactement comme les mutations ponctuelles. On représente une région délétée par une barre. Si aucun recombinant sauvage n'est obtenu dans un croisement entre des souches portant des délétions différentes, on représente les barres comme se chevauchant. Un exemple typique de carte de délétion pourrait être le suivant :



Des cartes de délétion de ce genre sont utiles pour identifier les régions d'un gène où de nouvelles mutations ponctuelles peuvent être localisées. Des mutations ne peuvent pas conduire à un phénotype sauvage dans des tests de recombinaison impliquant des délétions lorsque l'ADN correspondant à la région sauvage intéressant cette mutation n'est plus présent. Dès lors, les mutations peuvent être ordonnées par rapport à un jeu de délétions par des tests rapides qui n'exigent pas de mesures quantitatives approfondies.

La cartographie par délétion de la région rII

L'utilisation des délétions permit à Benzer de localiser rapidement de nouveaux sites mutationnels dans sa carte de la région *rII*. Il avait obtenu des mutants *rII* particuliers qui ne fournissaient pas de recombinants lorsqu'ils étaient croisés avec un certain nombre de mutants *rII* mais en donnaient cependant lorsqu'ils étaient croisés avec d'autres mutants *rII*. Benzer comprit que ces mutants se comportaient comme s'ils contenaient de brèves délétions dans la région *rII*, un modèle qui se vit étayé par l'absence de réversion de ces mutations.

Des mutants porteurs de délétions peuvent être utilisés pour la localisation rapide des sites mutationnels de nouveaux mutants. Considérons par exemple la carte suivante, comportant 12 sites mutationnels identifiables :

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

ROJIAST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

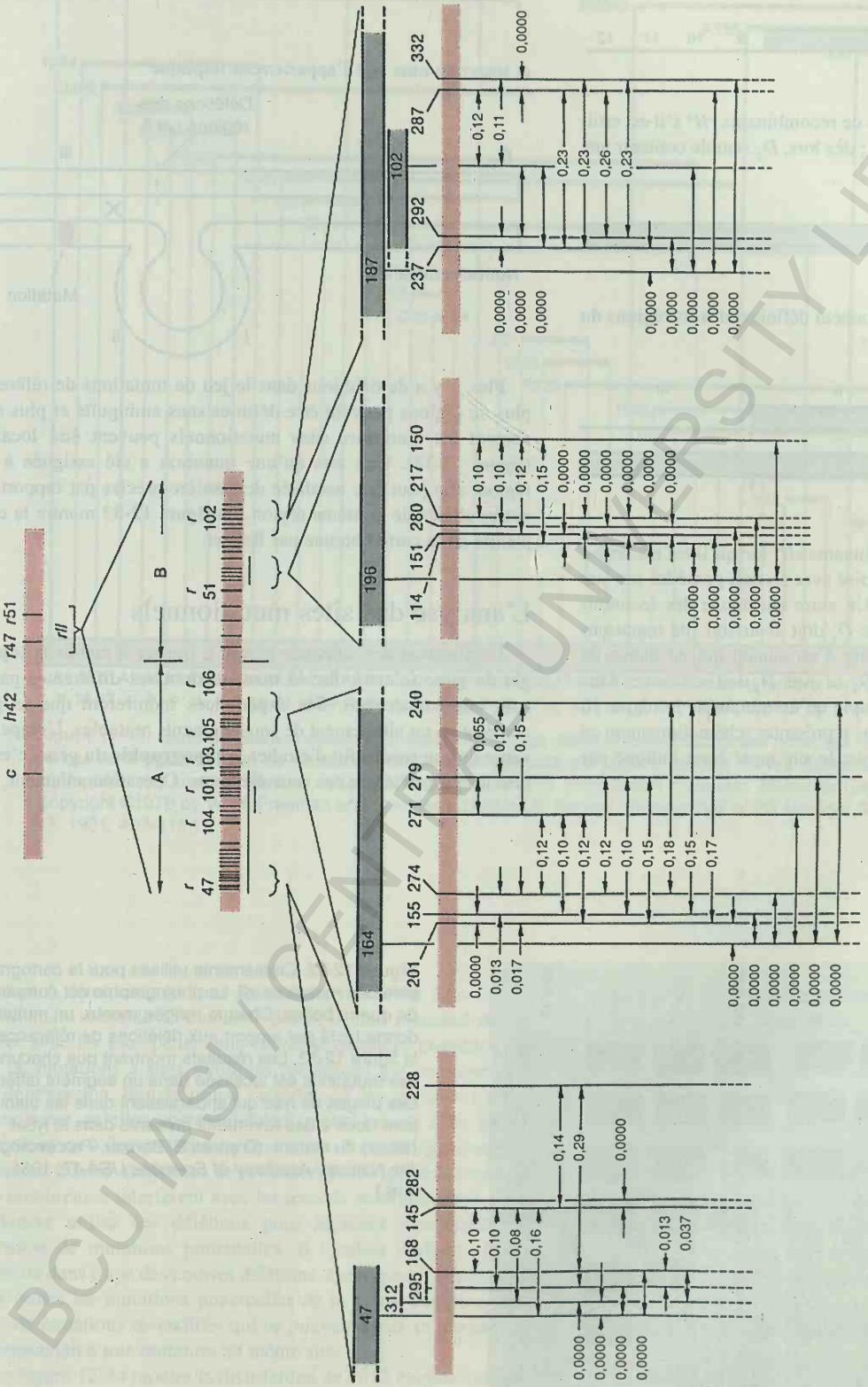


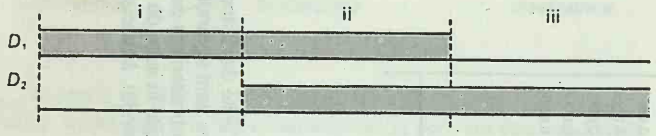
Figure 12-31. Carte de recombinaison détaillée de la région *rII* du chromosome du phage T4. L'unité de cartographie est le pourcentage de recombinants *rII*$^+$ obtenus dans les croisements entre deux mutants *rII*. Les régions intéressantes sont agrandies progressivement. Les nombres indiqués sur la carte représentent les sites mutationnels ; les nombres 47, 64, 196, 187 et 202 représentent des délétions. Il faut noter que les deux parties, A et B, de la région *rII* sont deux unités fonctionnelles différentes, ainsi que l'explique la suite du texte. (D'après S. Benzer, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 41, 1955, 344. De G. S. Stent et R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2ième éd. Copyright ©1978 by W. H. Freeman and Company.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

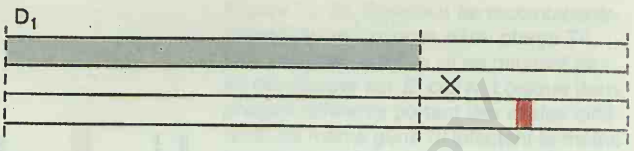
Supposons qu'un mutant particulier, D_1, ne fournit pas de recombinants *rII*$^+$ lorsqu'il est croisé avec les mutants touchés dans les sites *1, 2, 3, 4, 5, 6, 7* ou *8* ; D_1 se comporte par conséquent comme s'il portait une délétion couvrant les sites *1* à *8* :

Un autre mutant D_2 ne donne pas de recombinants *rII*$^+$ s'il est croisé avec *5, 6, 7, 8, 9, 10, 11* ou *12* ; dès lors, D_2 semble contenir une délétion des sites *5* à *12* :

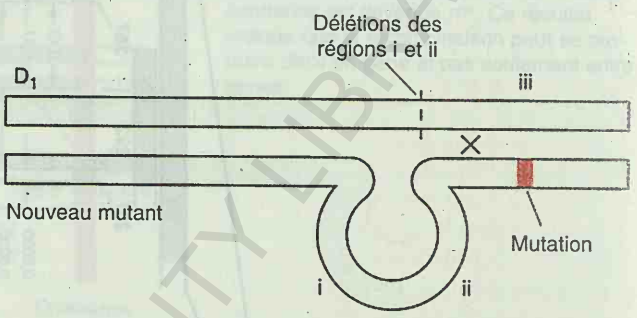
Ces deux délétions qui se chevauchent définissent trois régions du gène *rII*. Appelons les i, ii et iii :



Un mutant qui donne des recombinants *rII*$^+$ lorsqu'il est est croisé avec D_1 mais pas lorsqu'il est croisé avec D_2 doit posséder son site mutationnel dans la région iii. Un autre qui donne des recombinants *rII*$^+$ avec D_2 mais pas avec D_1 doit avoir son site mutationnel dans la région i. Enfin, le site d'un mutant qui ne donne de recombinants sauvages ni avec D_1, ni avec D_2 doit se trouver dans la région ii. Supposons par exemple qu'un mutant de la région iii soit croisé avec D_1. Nous pouvons représenter schématiquement ce croisement de la manière suivante, le site muté étant indiqué par une barre rouge :



et tracer comme suit l'appariement impliqué :



Plus il y a de délétions dans le jeu de mutations de référence, plus de régions peuvent être définies sans ambiguïté et plus rapidement les nouveaux sites mutationnels peuvent être localisés (figure 12-32). Une fois qu'une mutation a été assignée à une région, elle peut être localisée de manière précise par rapport aux autres allèles de la même région. La figure 12-33 montre la complexité de la carte obtenue par Benzer.

L'analyse des sites mutationnels

L'utilisation des délétions permit à Benzer d'établir la **topologie** du gène (c'est-à-dire la manière dont ses différentes parties sont interconnectées). Ses expériences montrèrent que le gène consiste en un alignement de sous-éléments mutables. L'étape suivante de son travail fut d'étudier la **topographie** du gène, c'est-à-dire les propriétés de ces sous-éléments. Opérationnellement, ceci

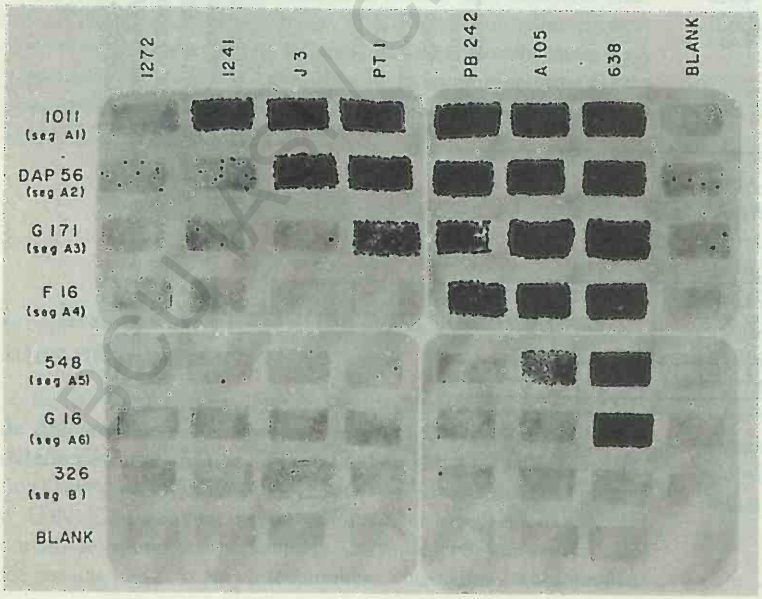


Figure 12-32. Croisements utilisés pour la cartographie des mutations *rII*. La photographie est composée de quatre boîtes. Chaque rangée montre un mutant donné testé par rapport aux délétions de référence de la figure 12-33. Les résultats montrent que chacune de ces mutations est localisée dans un segment différent. Les plages de lyse qui apparaissent dans les blancs sont dues à des révertants présents dans le lysat (stock) du mutant. (D'après S. Benzer, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 47, 1961, 403-416.)

BCU ARC / CENTRALE UNIVERSITY LIBRARY

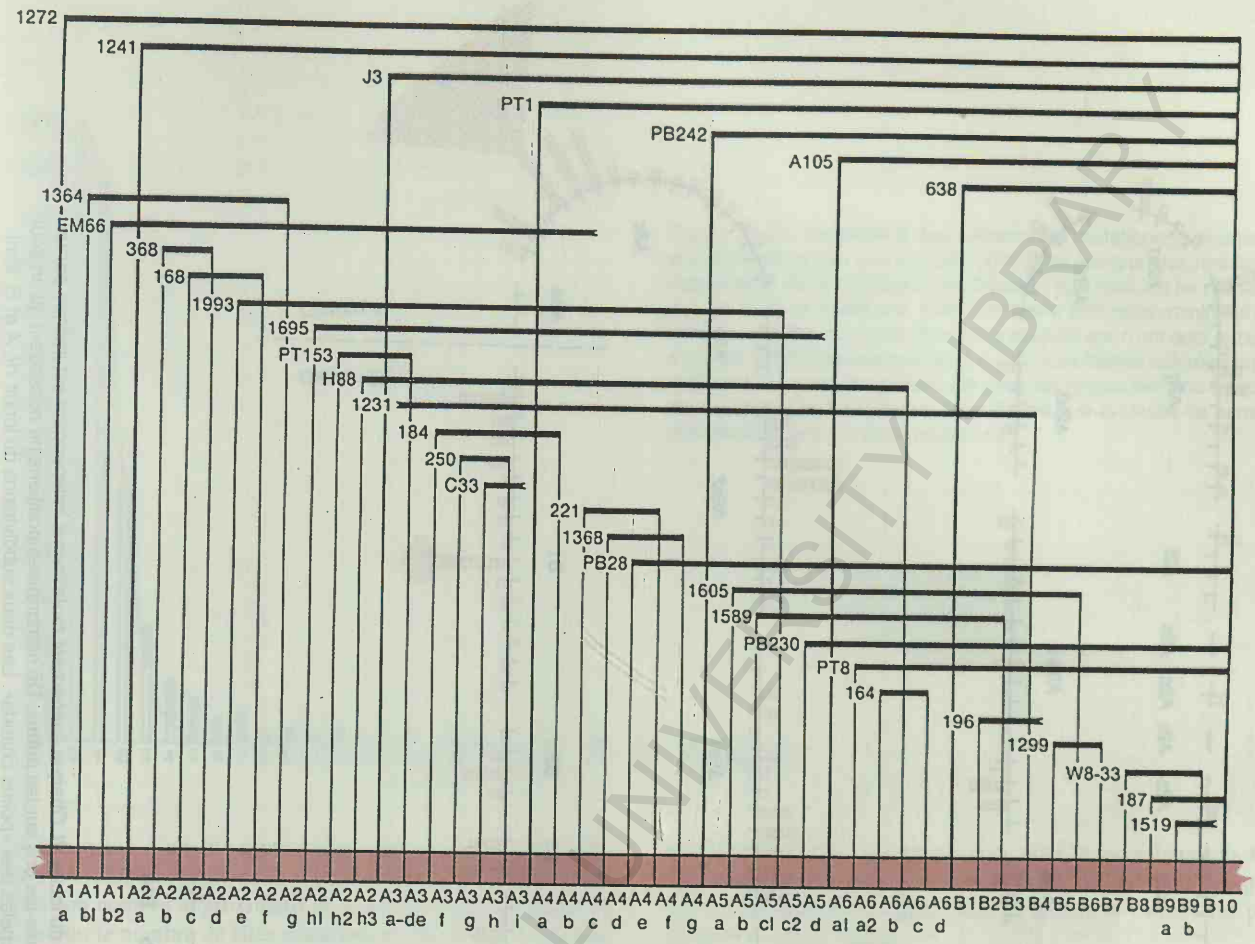
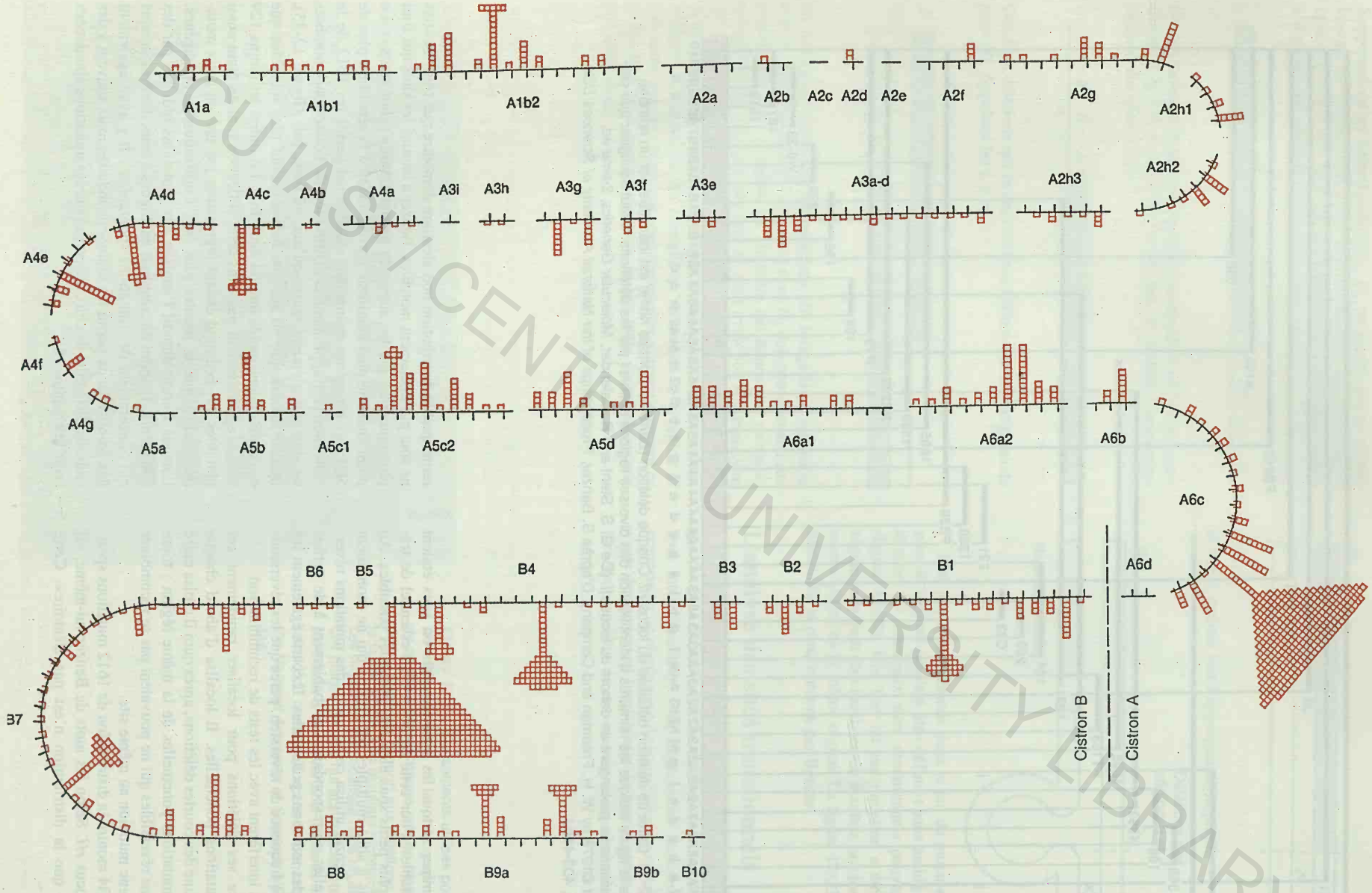


Figure 12-33. Carte de délétion détaillée du locus *rII*. Chaque délétion (*barre horizontale noire*) est identifiée par un nombre. Le bas de la figure indique les numéros d'identification des diverses régions définies par les délétions. Il faut souligner que certaines délétions se prolongent en dehors du locus *rII*. (De G. S. Stent and R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2ième éd. Copyright ©1978 by W. H. Freeman and Company. D'après S. Benzer, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 47, 1961, 403-416.)

revenait à déterminer si tous les sous-éléments ou sites étaient pareillement mutables. Pour cette étude, il était essentiel de travailler avec les plus petits sous-éléments mutables possibles. Au lieu de mutations à sites multiples (délétions) qui ne montraient pas de réversion, Benzer utilisa cette fois-ci des mutations réversibles parce qu'elles correspondaient probablement à de petites altérations ou à des mutations ponctuelles. Il écarta également les mutations à haute fréquence de réversion, parce que les réversions trop nombreuses interfèrent avec les tests de recombinaison.

Benzer utilisa ses délétions pour localiser rapidement cet ensemble de mutations ponctuelles. Il localisa d'abord chaque mutation dans l'une des courtes délétions, après quoi il croisa entre elles toutes les mutations ponctuelles de la même région ; toute paire de mutations réversibles qui ne pouvaient pas se recombiner correspondait à une mutation au même site.

La figure 12-34 montre la distribution de 1612 mutations spontanées dans le locus *rII*. Selon les mots de Benzer lui-même, «il saute aux yeux que la distribution n'est pas aléatoire». Cette remarquable distribution non aléatoire démontre que tous les sites ne sont pas également mutables. Benzer a baptisé les sites qui sont plus mutables que les autres de **points chauds** («hot spots»). Le point chaud le plus manifeste correspondait à la répétition plus de 500 fois du même événement mutationnel parmi les 1612 de la collection. En appliquant la distribution de Poisson aux nombres de sites qui n'étaient mutés qu'une ou deux fois (figure 12-35), Benzer montra que 60 sites au moins étaient plus mutables que ceux qui étaient mutés une ou deux fois. En outre, au moins 129 sites n'apparaissaient pas dans cette collection tout en étant aussi mutables que ceux qui étaient représentés par une ou deux mutations, ainsi que le montra plus tard l'utilisation de mutagènes. Lorsque Benzer étendit l'analyse aux mutations induites par des mutagènes, il obtint des résultats analogues à ceux des croisements qui concernaient des mutations spontanées : Il y avait également des points chauds parmi les mutations induites mais souvent à des endroits différents de ceux observés pour les mutations spontanées (voir le chapitre 18).



BCU IASH / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 12-34. La distribution de 1612 mutations spontanées le long du locus *rII*. Chaque événement mutationnel indépendant est indiqué par un carré. Lorsque des mutations sont identiques, les carrés sont dessinés les uns sur les autres. De nombreuses positions ne possèdent qu'un seul carré, alors que d'autres en ont un grand nombre ; ces sites sont appelés des «points chauds». Les deux subdivisions du locus *rII*, *A* et *B*, sont indiquées sur le schéma.

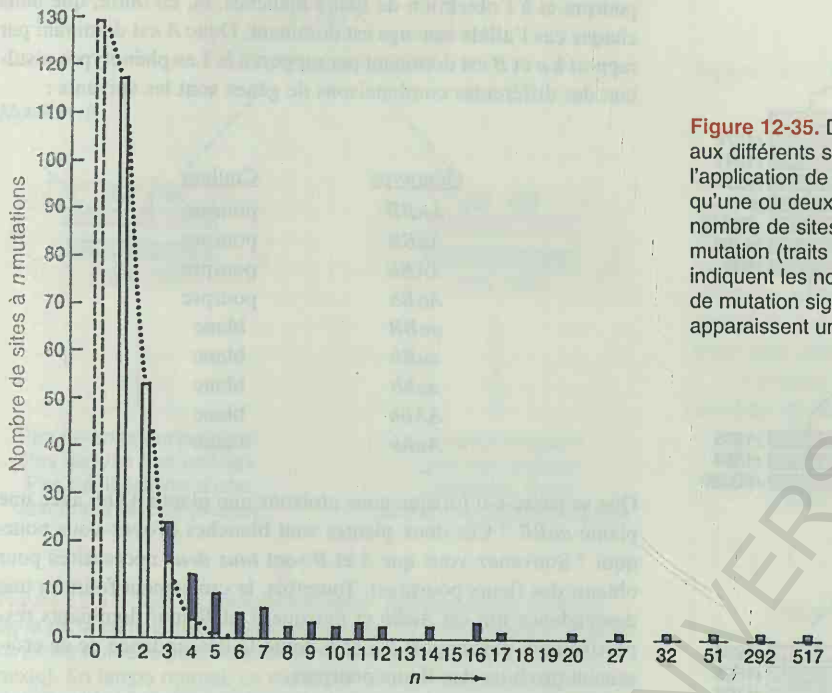


Figure 12-35. Distribution des évènements mutationnels spontanés aux différents sites. Les courbes pointillées montrent les résultats de l'application de la distribution de Poisson aux sites qui ne présentent qu'une ou deux mutations. Elle fournit une estimation minimale du nombre de sites de mutabilités comparables qui n'ont subi aucune mutation (traits interrompus pour $n = 0$). Les barres colorées en bleu indiquent les nombres minima de sites qui présentent une fréquence de mutation significativement plus élevée que la classe de ceux où apparaissent une ou deux mutations.

La dimension d'un site mutationnel était aussi un point intéressant. La taille physique de la région *rII* peut être utilisée pour calculer son nombre approximatif de paires de bases. A partir de cette valeur, le nombre de sites mutationnels fut évalué à environ un cinquième du nombre de paires de nucléotides. En d'autres mots, le plus petit site mutable correspondait au maximum à cinq paires de nucléotides. Le déchiffrement du code génétique (chapitre 13), ainsi que le travail (décrit précédemment dans ce chapitre) d'Ingram, de Yanofsky et d'autres qui établirent que des substitutions d'un seul acide aminé résultaient d'une seule mutation, permirent à Benzer de conclure qu'une mutation peut consister en l'altération d'une seule paire de nucléotides. (La détermination directe de la séquence de l'ADN, décrite au chapitre 14, a confirmé dans de nombreux cas la validité de ces conclusions.)

Message Le gène peut être divisé en une série linéaire de sous-éléments mutables qui correspondent aux différentes paires de nucléotides.

La réfutation de la théorie des perles

Examinons maintenant la théorie des perles à la lumière du travail de Benzer. Grâce à la cartographie par délétion, Benzer fut à même de localiser les unes par rapport aux autres un nombre énorme de mutations du locus *rII*. Ses expériences montrèrent que les mutations d'un même gène peuvent se recombiner. Ce résultat contredisait les principes de la génétique classique qui affirmaient que les gènes d'un chromosome peuvent être comparés au perles d'un collier et que la recombinaison peut se produire entre, mais non à l'intérieur, des gènes.

L'analyse de la structure fine du gène par Benzer démontrait que chaque gène était un alignement de sous-éléments ou sites qui peuvent être altérés par mutation et subir la recombinaison. Cette observation contredisait un autre principe de la théorie des perles qui voulait que seul un gène dans sa totalité — et non une partie de gène — soit mutable.

Le travail réalisé ultérieurement par divers chercheurs identifia chaque site génétique comme une paire de bases de l'ADN à double brin. La contribution de Benzer a donc consisté à combler le fossé qui séparait la génétique classique de la structure chimique de l'ADN révélée par Watson et Crick. Selon la théorie des perles, la structure de l'ADN de Watson et Crick n'avait aucun sens. Toutefois, la démonstration par Benzer que les gènes possèdent réellement une structure fine qui peut être mise en évidence par la seule analyse génétique permit la fusion des deux disciplines et fut le point de départ de l'ère de la génétique moléculaire. La figure 12-36 illustre l'analyse de la structure fine du locus *rII* et sa correspondance avec la structure de l'ADN.

La complémentation

Dans une autre partie de son œuvre, Benzer réalisa une série d'expériences destinées à définir le gène en termes de fonction. Il développa le concept de complémentation que nous avons brièvement discuté à la page 358. Bien que la complémentation apparaisse souvent comme une notion difficile à saisir lorsqu'elle concerne des organismes normalement haploïdes, elle représente une situation que nous avons abordée comme de la routine dans l'analyse génétique des organismes diploïdes. D'autre part, on confond souvent la complémentation avec la recombinaison : les différences qui les séparent seront envisagées un peu plus loin.

Avant d'aborder les expériences de Benzer sur la complémentation des mutants rII, passons en revue la complémentation chez les diploïdes.

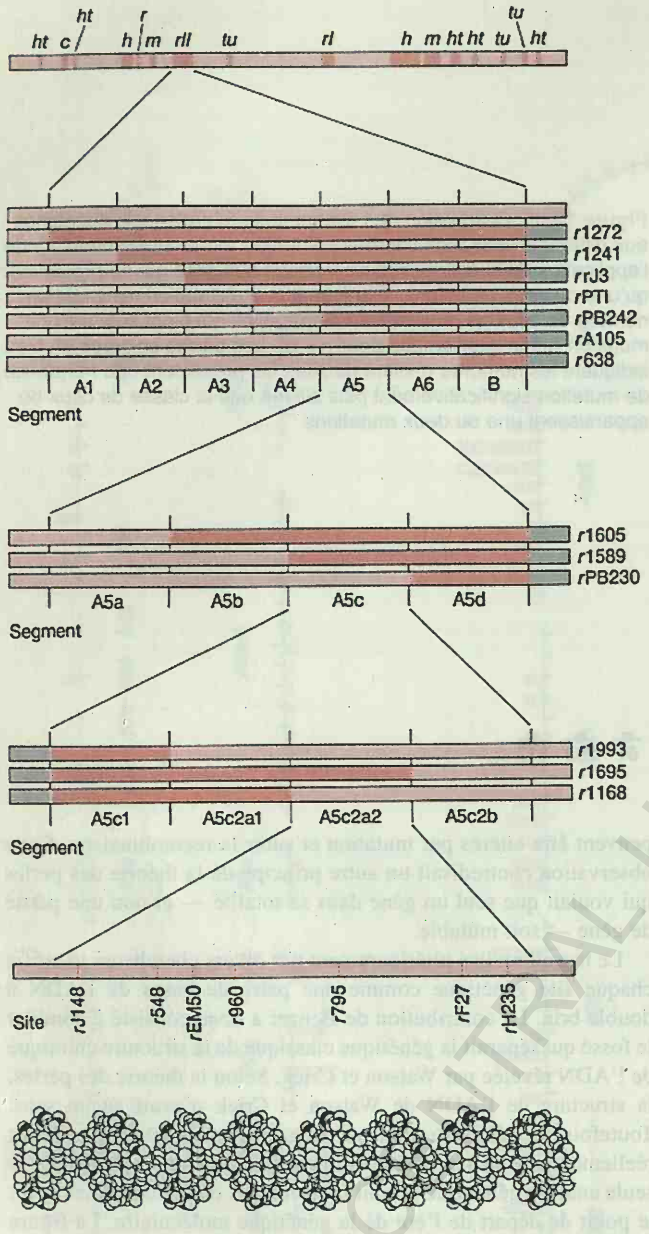


Figure 12-36. Analyse de la structure fine du locus *rII*. Cette technique cartographique localise la position d'une mutation donnée dans des segments de plus en plus petits de la molécule d'ADN contenue dans le phage T4. La région *rII* représente quelques pour cent seulement de la molécule entière (*en haut*). La localisation est effectuée en croisant un mutant inconnu avec des mutants de référence correspondant à des délétions (en couleur) de longueur connue dans la région *rII*. Chaque site représente la plus petite unité mutable dans la molécule d'ADN, une seule paire de bases. Le segment moléculaire (*tout en bas*), supposé être à peu près à la bonne échelle, contient un total d'environ 40 paires de bases (De S. Benzer, «The Fine Structure of the Gene». Copyright ©1962 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

La complémentation chez les organismes diploïdes

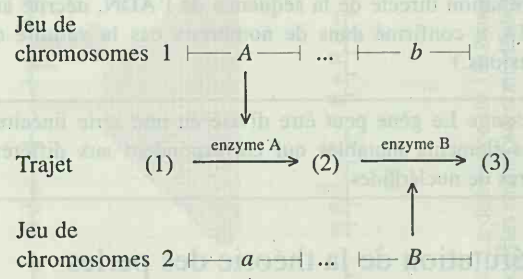
Supposons que nous étudions chez une cellule diploïde un phénotype qui exige les produits actifs de deux gènes. Considérons par exemple le cas déjà examiné en détail au chapitre 4 (voir aussi à la page 356 du présent chapitre) des fleurs des plantes de pois dont la couleur pourpre dépend de deux loci : *A* et *B*. Supposons que les mutations de *A* et de *B* conduisent à la perte de la couleur pourpre et à l'obtention de fleurs blanches, et, en outre, que dans chaque cas l'allèle sauvage est dominant. Donc *A* est dominant par rapport à *a* et *B* est dominant par rapport à *b*. Les phénotypes résultant des différentes combinaisons de gènes sont les suivants :

Génotype	Couleur
AABB	pourpre
AaBB	pourpre
AABb	pourpre
AaBb	pourpre
aaBB	blanc
aaBb	blanc
aabb	blanc
AAbb	blanc
Aabb	blanc

Que se passe-t-il lorsque nous croisons une plante *AAbb* avec une plante *aaBB* ? Ces deux plantes sont blanches.(Voyez-vous pourquoi ? Souvenez-vous que *A* et *B* sont *tous deux* nécessaires pour obtenir des fleurs pourpres). Toutefois, le croisement fournira une descendance qui est *AaBb* et puisque *A* et *B* sont dominants respectivement par rapport à *a* et *b*, toute la descendance de ce croisement produira des fleurs pourpres.

Voyons pourquoi il en est ainsi en termes de voies biosynthétiques cellulaires.

Puisque chaque parent est homozygote pour chaque locus, nous savons que tous les gamètes d'un parent sont *Ab* et tous ceux de l'autre *aB*. Le zygote formé par la fusion de ces deux gamètes et toutes les cellules qui en descendent vont effectuer les deux étapes de la voie qui conduit à la formation du pigment pourpre puisque chacun des deux chromosomes concernés fournit un des gènes fonctionnels. Nous pouvons schématiser ceci de la manière suivante, (1) étant le produit de départ dans le trajet cellulaire, (2) un composé intermédiaire et (3) le produit final nécessaire pour la pigmentation pourpre (A et B sont des enzymes hypothétiques produits par les gènes *A* et *B*) :



Notez qu'un des jeux de chromosomes (celui d'un des parents) fournit l'enzyme A et non l'enzyme B, tandis que le second jeu de chromosomes (celui de l'autre parent produit l'enzyme B mais pas l'enzyme A. Etant donné qu'une seule bonne copie de chaque gène est nécessaire pour produire chaque enzyme de cette voie biosynthétique, les deux jeux de chromosomes partiellement défectifs compensent leurs défectuosités respectives ; donc ils s'aident, ou **se complémentent** l'un l'autre.

Passons maintenant à la complémentation chez les organismes haploïdes.

BIOLOGY CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

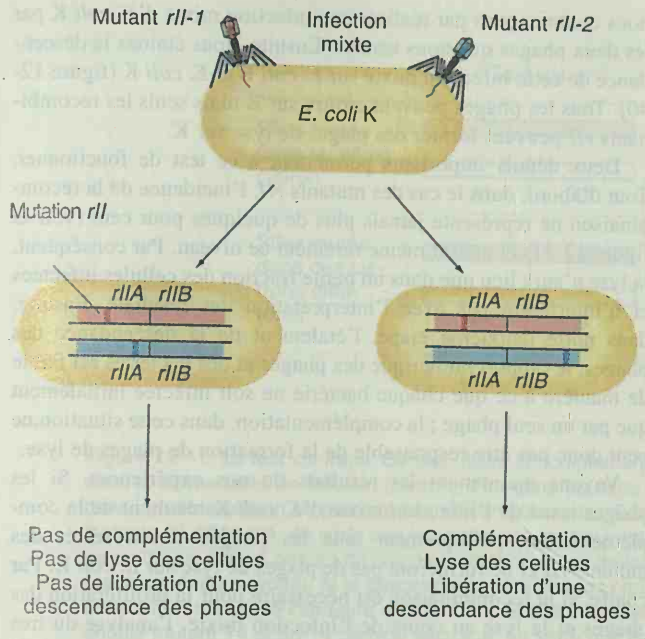


Figure 12-37. Test de complémentation : représentation schématique de la complémentation dans le locus *rII*. Deux mutants *rII* différents sont utilisés pour infecter simultanément *E. coli* K (infection mixte). En temps normal, un mutant *rII* ne peut ni lyser *E. coli* K, ni y produire de descendance. Toutefois, si les deux mutants peuvent se compléménter, la lyse et la croissance de phages auront lieu. Si les deux mutants *rII* sont incapables de se compléménter, ni lyse, ni croissance ne seront observées.

La complémentation chez le bactériophage T4

Benzer tenait à déterminer si toute la région *rII* du phage T4 agit comme une seule unité fonctionnelle ou si elle comprend plusieurs sous-unités qui agissent indépendamment. C'est pourquoi il testa les mutations qu'il avait localisées dans la région *rII* pour voir si les diverses combinaisons de paires de mutations pouvaient restaurer le phénotype sauvage. En d'autres mots, Benzer étudia la complémentation chez des cellules-hôtes d'*E. coli* qui étaient temporairement «diploïdes» pour le chromosome de T4. Dans ce but, il effectua une infection mixte avec différents mutants *rII* (figure 12-37). Le critère qu'il utilisa pour mettre en évidence le phénotype sauvage était la capacité de lyser les cellules-hôtes d'*E. coli* K. (Souvenez-vous que les mutants *rII* en sont incapables tandis que les phages de type sauvage le peuvent.)

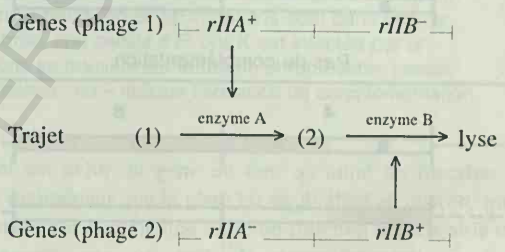
Des tests de complémentation comme ceux de Benzer sont réalisés en un seul cycle d'infection ; ils n'impliquent pas les cycles de réinfection multiples requis pour la formation de plages de lyse. Des échantillons des deux phages à tester sont étalés au moyen d'une bandelette de papier sur un tapis de bactéries-hôtes dans un secteur de boîte de Petri. On utilise une haute multiplicité des phages par rapport aux bactéries de façon à être certain que pratiquement chaque bactérie soit infectée par un phage de chaque type. Après une période d'incubation, la croissance ou l'absence de croissance des bactéries dans la zone infectée indique si les bactéries se sont lysées ou non à la suite de l'infection phagique.

En appliquant ces tests de complémentation à un grand nombre de paires de mutants différents, Benzer parvint à partager les mutants en deux groupes appelés *A* et *B*. Toutes les mutations du

Figure 12-38. Carte génétique de la région *rII*.

groupe *A* complémentaient toutes celles du groupe *B*, alors qu'aucune mutation du groupe *A* ne complémentait une autre mutation du groupe *A* ; de même aucune mutation du groupe *B* ne complémentait d'autres mutations du groupe *B*. Benzer constata que toutes les mutations du groupe *A* étaient localisées dans une même moitié du locus *rII* tandis que toutes les mutations du groupe *B* se trouvaient dans l'autre moitié de ce locus (figure 12-38).

Le schéma suivant décrit un modèle du locus *rII* fondé sur les résultats de Benzer :



Dans notre modèle, nous supposons que les deux gènes, dénommés *rIIA* et *rIIB*, sont impliqués dans la lyse. Nous pouvons imaginer deux étapes, (1) et (2), chacune contrôlée par une enzyme spécifiée par un des gènes *rII* de type sauvage. Les gènes *rIIA* et *rIIB* détermineraient donc les enzymes A et B, tandis que *rIIA*⁻ et *rIIB*⁻ seraient deux mutants *rII* différents possèdant des altérations dans les gènes *rIIA* et *rIIB*.

Comme chaque chromosome de phage peut programmer la synthèse d'une des enzymes requises pour le trajet cellulaire, la lyse peut se dérouler, ce qui correspond au phénotype sauvage. Donc, les deux phages se complémentent l'un l'autre. Remarquez la quasi-identité de cette situation avec l'exemple de la couleur pourpre des fleurs décrit plus haut. La seule différence est que les cellules diploïdes de plantes sont persistantes et restent diploïdes tandis que les expériences de double infection par le phage T4 créent une cellule qui ressemble temporairement à une cellule diploïde pour le chromosome du phage T4. La complémentation ne peut avoir lieu que pendant l'existence de cette cellule «diploïde». Il faut aussi noter combien la complémentation du phage T4 chez *E. coli* est similaire à la complémentation dans les hétérocaryons de *Neurospora* décrits à la page 358.

Recombinaison et complémentation

Il est important de comprendre la différence qui existe entre la recombinaison et la complémentation. La recombinaison consiste en la création de nouvelles combinaisons de gènes par cassure et réunion de chromosomes. La descendance d'un croisement où a eu lieu une recombinaison possède *des génotypes nouveaux* qui sont différents de ceux des parents. Au contraire, la complémentation n'implique aucun changement des génotypes liés aux chromosomes individuels ; elle représente simplement le *mélange des pro-*

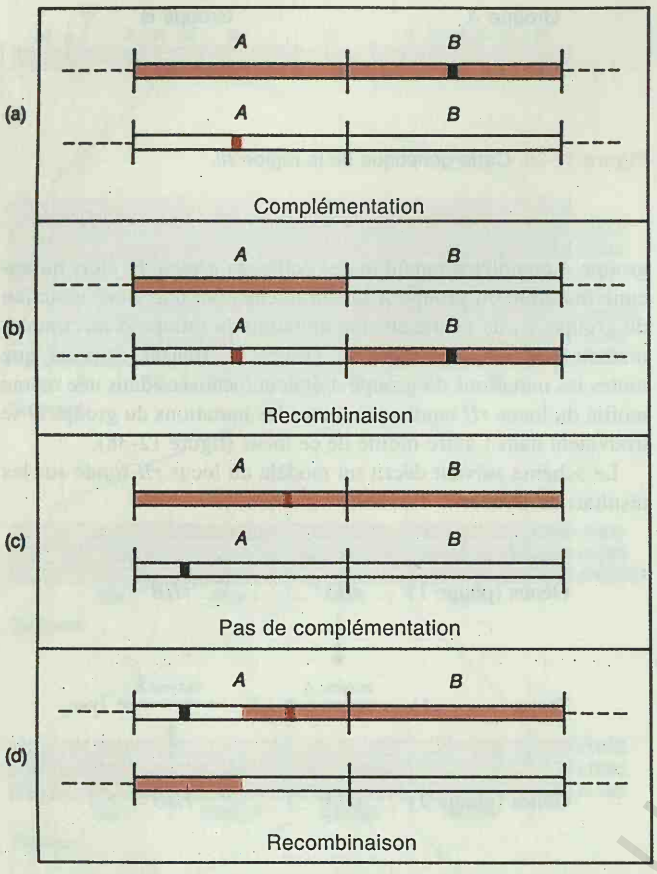


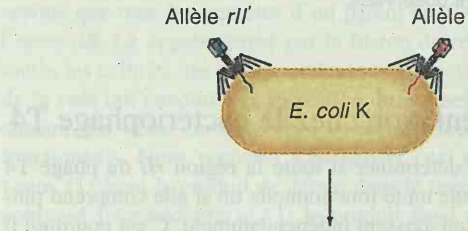
Figure 12-39. La comparaison des conséquences génétiques de la complémentation et de la recombinaison. (a) Les paires de mutants peuvent se complémenter, puisque les produits normaux des gènes *A* et *B* peuvent se mélanger dans le cytoplasme. (b) Si la recombinaison a lieu, un réarrangement des génomes s'effectue. (c) Les paires de mutants ne peuvent pas se complémenter parce qu'aucun mutant ne peut produire le produit normal du gène *A*. (d) Un événement relativement rare de recombinaison pourrait aboutir à la formation d'un phage de type sauvage.

duits des gènes. La complémentation s'effectue pendant que les deux chromosomes sont dans la même cellule et assurent chacun une des fonctions. Par la suite, les chromosomes respectifs restent inaltérés. Dans le cas des mutants *rII,* la complémentation a lieu lorsque deux chromosomes de phages différents, portant des mutations dans des gènes *rII* différents, se trouvent dans la même cellule-hôte. Mais la descendance qui résulte de cette complémentation ne possède que les génotypes parentaux. La figure 12-39 schématise certaines des différences qui séparent ces deux processus fondamentaux. La situation présentée dans la figure 12-39a permettra la croissance du phage et la lyse (complémentation) sans aucun réarrangement des chromosomes de phage, tandis que la paire de mutants montrés dans la figure 12-39c ne les permettra pas. La recombinaison peut se produire dans les deux cas, comme le montrent les parties b et d de la figure.

Comment faire une distinction opérationnelle entre la complémentation et la recombinaison ? Pour les distinguer de manière définitive nous pourrions effectuer une analyse génétique supplémentaire : dans le cas des mutants *rII*, elle consisterait par exemple à examiner le génotype de la descendance des phages. A cette fin, nous commençons par réaliser une infection mixte d'*E. coli* K par les deux phages que nous testons. Ensuite, nous étalons la descendance de cette infection mixte sur *E. coli* B et *E. coli* K (figure 12-40). Tous les phages peuvent croître sur B mais seuls les recombinants *rII* peuvent former des plages de lyse sur K.

Deux détails importants permettent à ce test de fonctionner. Tout d'abord, dans le cas des mutants *rII,* l'incidence de la recombinaison ne représente jamais plus de quelques pour cent (voir la figure 12-31) et atteint même rarement ce niveau. Par conséquent, la lyse n'aura lieu que dans un petite fraction des cellules infectées et n'interférera pas avec l'interprétation des résultats. Ensuite, dans notre deuxième étape, l'étalement de la descendance des phages, le rapport numérique des phages et des bactéries est faible de manière à ce que chaque bactérie ne soit infectée initialement que par un seul phage ; la complémentation, dans cette situation ne peut donc pas être responsable de la formation de plages de lyse.

Voyons maintenant les résultats de nos expériences. Si les phages issus de l'infection mixte d'*E. coli* K résultent de la complémentation, pratiquement tous les phages seront restés des mutants *rII* et ne formeront pas de plages de lyse sur *E. coli* K. Par contre, si la recombinaison est nécessaire pour la prolifération des phages et la lyse au cours de l'infection mixte, l'analyse du très petit nombre de phages formés montrera qu'environ la moitié d'entre eux sont des recombinants rII^+ et forment des plages de lyse sur K (figure 12-40).



Complémentation dans *E. coli* K	Tous les phages forment des plages ; nombre de phages élevé.	Presqu'aucun phage ne donne de plages, parce qu'ils sont encore des mutants *rII.* Seuls de rares recombinants (moins d'un % du titre sur *E. coli* B) forment des plages.
Recombinaison dans *E. coli* K	Tous les phages forment des plages; très petit nombre de phages.	Environ 50 % de tous les phages qui forment des plages sur *E. coli* B sont des recombinants sauvages et forment des plages sur *E. coli* K

Figure 12-40. L'analyse des phages issus de l'infection mixte d'*E. coli* K. Si une complémentation se produit entre deux mutants *rII,* les phages qui sont libérés seront encore principalement *rII* et seront incapables de former des plages de lyse lors d'infections simples d'*E. coli* K. Si une recombinaison, et non une complémentation, a lieu, on obtiendra un rendement en phages très diminué en raison de la rareté de la recombinaison. Par contre, les quelques phages formés consisteront à raison de 50 pour cent de recombinants sauvages et formeront des plages lors d'infections simples d'*E. coli* K.

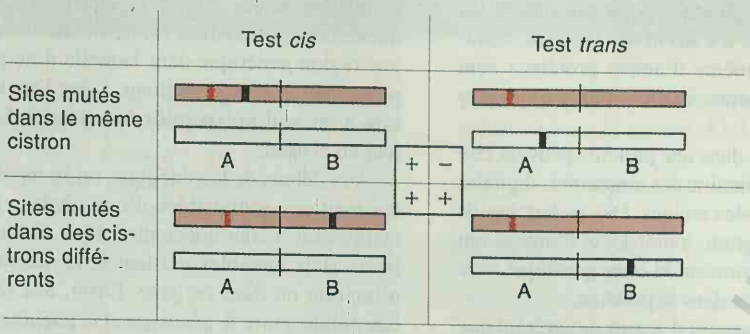


Figure 12-41. Le test *cis-trans*. Ce test utilise la complémentation pour déterminer si deux sites mutationnels sont localisés dans la même unité de fonction (cistron) d'un gène ou dans des unités de fonction différentes : Des mutations qui se trouvent dans le même cistron ne peuvent pas se complémenter. Dans le test *trans*, une cellule d'*E. coli* K est infectée par deux mutants *rII* différents, de sorte que les mutations se trouvent sur des chromosomes différents. Si la descendance des phages ne croît pas, il n'y a pas eu de complémentation et les mutations sont localisées dans la même unité de fonction, ou cistron (*case supérieure droite*). Si la descendance des phages croît, il y a eu complémentation et les mutations sont dans des cistrons différents (*case inférieure droite*). Dans le test cis, utilisé comme contrôle, une cellule d'*E. coli* K est infectée par un double mutant T4 et un T4 de type sauvage, de sorte que les deux mutations se trouvent sur le même chromosome (cases supérieure et inférieure droites). Un + représente une complémentation effective : un – indique l'absence de complémentation.

Le cistron

Les mutations incapables de se complémenter doivent affecter la même unité de fonction ; les mutations qui se complémentent doivent affecter des unités de fonction différentes. Benzer a appelé ces unités de fonction des **cistrons.**

Le cistron tire son nom du **test cis-trans,** le terme utilisé par Benzer pour décrire un test de complémentation complet où les sites mutationnels envisagés se trouvent sur le même chromosome (*en cis*) et sur des chromosomes opposés (*en trans*), comme le montre la figure 12-41. Le volet *cis* du test est en réalité un témoin ; le volet *trans* est le test de complémentation proprement dit. En résumé, le test *cis-trans* (ou test de complémentation) est réalisé pour déterminer si deux mutations sont localisées dans la même unité de fonction ou dans des unités distinctes.

Message Un **cistron** est une région génétique dans laquelle on n'observe pas normalement de complémentation entre les mutations. Le cistron est équivalent au gène.

La complémentation et le concept de gène

Des trois principes qui définissaient le gène dans la classique théorie des perles, le seul aspect qui ait résisté et semble le plus essentiel est celui du gène en tant qu'unité de fonction. Nous voyons maintenant que le gène est équivalent au cistron, que l'on peut considérer comme une unité de fonction définissable expérimentalement par un test de complémentation *cis-trans*. Occasionnellement, il peut y avoir des exceptions à cette définition opérationnelle exprimée par le test *cis-trans*. Par exemple, certains gènes codent pour des polypeptides qui forment des protéines multimériques ; dans de rares cas, ils présentent une **complémentation intragénique (intracistronique)** dans laquelle les monomères isolés de la protéine sont inactifs mais se combinent pour former un multimère actif, fonctionnel. En outre, certaines mutations affectent l'expression de plus d'un gène et il ne pourrait pas y avoir de complémentation pour des mutations affectant ces gènes. Toutefois, ces exceptions ne suffisent pas à remettre en question le concept du gène en tant qu'unité de fonction.

Nous savons à présent qu'un cistron est une région du génome qui code pour une chaîne polypeptidique. Dès lors, la relation un gène — une enzyme peut être envisagée d'une manière plus précise sous la forme de l'hypothèse **un cistron — un polypeptide,** en insistant sur le fait que les cistrons (gènes) peuvent aussi coder pour des protéines autres que les enzymes.

RÉSUMÉ

Le travail de Beadle et Tatum dans les années quarante établit qu'un gène code pour une protéine, souvent pour une enzyme. Lorsqu'une enzyme ne peut pas fonctionner normalement à la suite d'une mutation, il en résulte un phénotype variant. Les phénotypes variants sont souvent le fondement d'une maladie génétique chez l'homme comme chez tous les organismes vivants. Pour comprendre comment des enzymes anormales sont responsables de changements phénotypiques, nous devons comprendre la structure des protéines. Formées par un enchaînement spécifique d'acides aminés unis entre eux par des liens peptidiques, les protéines prennent des configurations tridimensionnelles spécifiques qui sont déterminées par les interactions des 20 acides aminés qui

BCU LAUSANNE - TRY UNIVERSITY LIBRARY

en combinaisons variables constituent leurs chaînes polypeptidiques. Différentes régions de cette chaîne repliée constituent les sites de liaison et d'interaction avec les substrats. De plus, beaucoup d'enzymes fonctionnelles et même d'autres protéines sont formées par l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques dans une structure multimérique.

Les changements d'acides aminés dans une protéine peuvent être décelés par des techniques de détermination des empreintes digitales (finger-prints) et des séquences d'acides aminés. Des recherches de ce genre, poursuivies par Sanger, Ingram, Yanofsky et d'autres, ont établi la colinéarité des sites de mutation sur la carte génétique avec les positions des acides aminés altérés dans la protéine.

Les recherches ultérieures de Benzer et d'autres montrèrent que le gène pouvait être disséqué en portions de plus en plus petites. Les unités structurales de mutation et de recombinaison furent identifiées et se révélèrent équivalentes à une seule paire de nucléotides. Un cistron est défini au niveau phénotypique comme une région génétique dans laquelle il ne peut pas y avoir de complémentation entre mutations. C'est l'unité qui code pour la structure d'un seul polypeptide fonctionnel. Le gène est donc équivalent au cistron.

Aux débuts de la génétique, on se représentait les gènes comme les maillons indivisibles d'une chaîne. Nous sommes parvenus maintenant à une conception bien différente du gène. De nombreux sites mutables existent et la recombinaison peut avoir lieu n'importe où dans ce gène. Enfin, une relation plus précise a pu être établie entre le génotype et le phénotype une fois qu'on a compris qu'un cistron est responsable de la synthèse d'un polypeptide.

Diagramme conceptuel

Dressez un diagramme conceptuel qui établisse une relation entre le plus grand nombre possible parmi les termes qui figurent dans la liste qui suit. Notez que ces termes ne sont mentionnés dans aucun ordre particulier.

allèle / mutation / trajet biosynthétique / enzyme / catalyse / auxotrophe / dominant / récessif / complémentation / cistron / délétion / liaison peptidique / polypeptide / séquence d'acides aminés / recombinaison

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Nous avons vu au chapitre 4 que l'allèle de type sauvage de l'hémoglobine, Hb^A, se montre dominant vis -à-vis de Hb^S (l'allèle de l'anémie à cellules falciformes) en ce qui concerne l'anémie mais codominant pour les propriétés électrophorétiques de l'hémoglobine. Expliquez les différents types de dominance en termes de séquence protéiques sur la base de la connaissance de la structure protéique que vous avez acquise au chapitre 12.

Solution

L'hémoglobine comporte deux chaînes polypeptidiques α et deux chaînes β étroitement associées pour former une structure quaternaire élaborée qui maintient le groupement hème qui fournit l'oxygène aux tissus. La structure primaire d'une protéine — la séquence linéaire des acides aminés qui la composent— détermine finalement ses structures tertiaire et quaternaire et, donc, son activité. En raison du changement d'un acide glutamique en valine à la position 6 de sa chaîne β, la structure de l'hémoglobine de l'anémie à cellules falciformes est modifiée de telle sorte qu'elle transporte moins d'oxygène que l'hémoglobine adulte normale (HbA). Les hétérogénotes (Hb^A Hb^S) conservent une capacité de transport de l'oxygène suffisante pour éviter les graves symptômes de l'anémie à cellules falciformes. Hb^A est donc dominant par rapport à Hb^S en ce qui concerne l'anémie. La substitution d'une valine par un acide glutamique change également la charge de la molécule de telle sorte qu'HbS se déplace plus lentement que HbA dans une électrophorèse sur gel (voir la figure 4-4). Les deux molécules d'hémoglobine (HbA et HbS) se montrent donc codominantes pour leurs propriétés électrophorétiques, puisqu'elles peuvent être séparées et détectées par cette technique.

BOSPHORUS UNIVERSITY LIBRARY

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Divers couples de mutations *rII* du phage T4 sont testées dans *E. coli* dans les configurations *cis* et *trans* et les nombres moyens de particules de phage produites par bactérie («burst size») sont comparés. Les résultats obtenus pour six mutants *r* différents—*rM, rN, rO, rP, rR et rS*—sont les suivants (+ indique l'allèle sauvage).

Génotype *cis*	Nombre de phages produits par bactérie	Génotype *trans*	Nombre de phages produits par bactérie
rM rN / ++	245	*rM* + / + *rN*	250
rOr P / ++	256	*rO* + / + *rP*	268
rR rS / ++	248	*rR* + / + *rS*	242
rM rO / ++	270	*rM* + / + *rO*	0
rM rP / ++	255	*rM* + / + *rP*	255
rM rR / ++	264	*rM* + / + *rR*	0
rM rS / ++	240	*rM* + / + *rS*	240
rN rO / ++	257	*rN* + / + *rO*	268
rN rP / ++	250	*rN* + / + *rP*	0
rN rR / ++	245	*rN* + / + *rR*	255
rN rS / ++	259	*rN* + / + *rS*	0
rP rR / ++	260	*rP* + / + *rR*	245
rP rS / ++	253	*rP* + / + *rS*	0

Si nous plaçons la mutation *rO* dans le cistron A, quelles sont les localisations des cinq autres mutations par rapport aux cistrons A et B ? (NOTE : Ce problème est analogue au problème 21 de la liste de problèmes qui suit.)

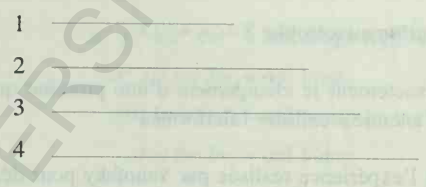
Solution

Pour résoudre un problème comme celui-ci, il faut d'abord rechercher le principe sous-jacent et dresser un schéma qui aidera à trouver la solution. Le principe essentiel est que, en configuration *trans*, des mutations du même cistron ne pourront pas se complémenter et ne fourniront donc pas de descendance ; au contraire, des mutations affectant des cistrons différents se complémenteront et produiront une descendance d'importance normale. Puisque *rO* se trouve dans le cistron *A*, nous partons du diagramme initial suivant :

Nous pouvons maintenant regarder les résultats du test proposé dans l'énoncé du problème et assigner chaque mutation à un cistron sur la base de ce qu'il y a ou non complémentation lors d'une infection mixte avec les mutants *rO*. Dans ce tableau, il est évident que les mutations *N, P* et *S* complémentent la mutation *O* et doivent être localisées dans un autre cistron (le cistron B), tandis que la mutation *M* ne complémente pas *O* et doit être située dans le même cistron (le cistron A). L'arrangement est donc

Nous pouvons vérifier cette répartition en examinant les autres croisements pour voir si leurs résultats sont en accord avec notre interprétation.

2. La carte ci-dessous comporte quatre délétions (1 à 4) qui affectent le cistron *rIIA* du phage T4 :



Cinq mutants portant des mutations ponctuelles (*a* à *e*) sont examinés pour leur aptitude (+) ou leur inaptitude (—) à fournir des recombinants sauvages (r^+) lorsqu'ils sont croisés avec les mutants porteurs de ces délétions ; les résultats sont

	a	*b*	*c*	*d*	*e*
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	–	–
3	+	–	+	–	–
4	–	–	+	–	–

Quel est l'ordre des mutations ponctuelles ?

Solution

Ici, le principe de base est que les mutations ponctuelles peuvent se recombiner avec les délétions *qui ne s'étendent pas* jusqu'à ces mutations mais ne peuvent pas se recombiner avec les délétions *qui les recouvrent*. Dans le test dont les résultats sont présentés dans l'énoncé du problème, toute mutation qui se recombine avec la délétion 1 doit être située à droite de cette délétion de même que toute mutation qui se recombine avec la délétion 2, est située à droite de cette délétion, et ainsi de suite. Considérons la mutation ponctuelle *a*. Elle se recombine avec les délétions 1, 2 et 3 mais pas avec la délétion 4. Donc elle se trouve à droite des délétions 1, 2 et 3 mais pas à droite de la délétion 4. Nous pouvons donc placer la mutation *a* dans l'intervalle qui sépare les délétions 3 et 4. La mutation ponctuelle *b* se recombine avec les délétions 1 et 2 et doit se trouver à leur droite. Elle ne se recombine pas avec les délétions 3 et 4 et doit donc être localisée entre les délétions 2 et 3. La mutation ponctuelle *c* se recombine avec toutes les délétions et se trouve à la droite de toutes ces délétions, y compris la

PCU IAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

délétion 4. Finalement, les mutations ponctuelles *d* et *e* ne se recombinent qu'avec la délétion 1 et doivent se trouver entre les délétions 1 et 2. La solution à laquelle nous sommes parvenus se résume comme suit :

1 ——— *e, d*
2 ——— *b*
3 ——— *a*
4 ——— *c*

Le problème 25, dans la série qui suit, est analogue à celui-ci. Voyez si vous pouvez appliquer le raisonnement développé ici à sa résolution.

PROBLÈMES

1. Décrivez les structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire d'une protéine. Donnez si possible des exemples de chaque type de structure.

2. Qu'est-ce que l'hypothèse un gène-une enzyme ?

3. Qu'est-ce qu'un auxotrophe ?

4. Quel est exactement le changement d'une protéine qui est responsable de l'anèmie à cellules falciformes ?

5. Qu'elle est l'expérience réalisée par Yanofsky pour démontrer la colinéarité d'un gène et d'une protéine ?

6. Qu'elle est la différence qui existe entre la complémentation et la recombinaison ?

7. Complétez le tableau suivant en y introduisant les types de plages de lyse.

	Type de souche d'*E. coli*	
Phage T4	B	K
rII	?	?
rII$^+$	?	?

8. Une variété de mille-pertuis (*Hypericum*) est toxique pour les animaux albinos. Elle provoque en outre des ampoules chez les animaux qui possèdent des taches blanches dans la fourrure. Proposez une explication génétique pour cette réaction.

9. Chez l'homme, la galactosémie cause un retard mental à un âge précoce parce que le lactose du lait ne peut pas être décomposé et ce défaut altère le fonctionnement du cerveau. Quel traitement indirect de la galactosémie proposez-vous ? Vous attendez-vous à ce que ce phénotype soit dominant ou récessif ?

10. La technique de l'amniocentèse consiste à insérer une aiguille de seringue à travers la paroi abdominale d'une femme enceinte, jusque dans la cavité amniotique, la poche qui entoure l'embryon en cours de développement, et à prélever une petite quantité du liquide amniotique. Ce liquide contient des cellules provenant de l'embryon (mais pas de cellules de la mère). Ces cellules peuvent être cultivées ; elles se diviseront et se développeront pour former une population de cellules sur laquelle des analyses enzymatiques et caryotypiques pourront être exécutées. De quelle utilité sera cette technique pour un conseiller génétique ? Citez au moins trois affections pour lesquelles le recours à l'amniocentèse serait utile. (REMARQUE : Cette technique entraîne un risque faible mais néanmoins réel pour la santé de la mère aussi bien que pour celle de l'embryon ; tenez-en compte dans votre réponse.)

11. Le tableau 12-7 montre les gammes d'activité enzymatique (en unités dont nous n'avons pas à nous préoccuper ici) observées pour les enzymes impliquées dans deux maladies métaboliques récessives de l'homme. Des données semblables existent pour beaucoup d'autres maladies.

a. Quelle est l'utilité de telles données pour un conseiller génétique ?

b. Indiquez les sources possibles d'ambiguïté dans l'interprétation des données qui concernent un malade particulier.

c. Reconsidérez le concept de dominance à la lumière de ces valeurs.

Tableau 12-7.

Maladie	Enzyme concernée	Gamme d'activité enzymatique		
		Patients	Parents des patients	Individus normaux
Acatalasie	Catalase	0	1,2 — 2,7	4,3 — 6,2
Galactosémie	Gal-1-P uridyl transférase	0 — 6	9 — 30	25 — 40

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

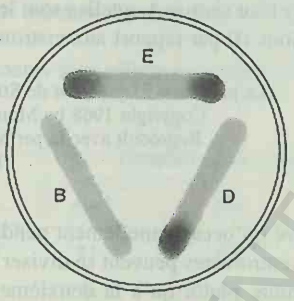
12. Deux albinos se marient et ont un enfant normal. Comment ceci est-il possible ? Suggérez au moins deux explications (Cette question a été traitée au chapitre 4. Réexaminez-la maintenant sur la base de votre connaissance des voies biosynthétiques.)

13. Chez l'homme, la phénylcétonurie (PCU) est une maladie causée par un défaut d'activité de l'enzyme impliquée à l'étape A de la séquence réactionnelle illustrée ci-dessous et l'alcaptonurie (ACU) touche l'enzyme correspondant à une des réactions résumées ici par l'étape B :

$$\text{phénylalanine} \xrightarrow{A} \text{tyrosine} \xrightarrow{B} CO_2 + H_2O$$

Une personne souffrant de PCU épouse une personne affligée d'ACU. Quels phénotypes prévoyez-vous pour leurs enfants ? a) Tous normaux ; b) tous affligés seulement de PCU ; c) tous atteints seulement d'ACU ; d) tous atteints des deux maladies ; e) certains atteints de PCU et d'autres d'ACU.

14. Trois souches de levure exigeant le tryptophane obtenues indépendamment sont appelées *trpB*, *trpD* et *trpE*. Des suspensions de cellules de chaque souche servent à faire des stries sur une boîte de Pétri contenant juste assez de tryptophane pour permettre une faible croissance d'un mutant trp^-. Des stries sont disposées en triangle de manière à ne pas se toucher. Une croissance abondante est observée aux deux extrémités de la strie de la souche *trpE* et à une des extrémités de la strie de la souche *trpD*.



*a. Croyez-vous que la complémentation intervient dans le phénomène observé ?

b. Expliquez brièvement le profil de croissance abondante observé.

c. Dans quel ordre les étapes enzymatiques déficientes dans les souches *trpB*, *trpD* et *trpE* participent-elles à la voie de biosynthèse du tryptophane ?

d. Pourquoi est-il nécessaire d'ajouter une petite quantité de tryptophane au milieu de culture pour observer un tel profil de croissance ?

15. Dans les pupes de *Drosophila*, des structures appelées disques imaginaux peuvent être décelées par l'épaississement de la peau ; après la métamorphose, ces disques imaginaux deviennent des organes spécifiques de la mouche adulte. George Beadle et Boris Ephrussi développèrent le moyen de transplanter les disques imaginaux de l'œil d'une larve dans une autre larve. Lorsque la larve hôte se métamorphose en adulte, le transplant devient visible sous forme d'un œil coloré situé dans l'abdomen. Ces chercheurs partirent de deux souches de mouches à phénotypes identiques du point de vue de la couleur rouge vif des yeux : l'un dû à la mutation vermillon (*v*) liée au sexe, l'autre à la mutation cinabre (*cn*) sur le chromosome 2. Lorsque des disques *v* sont transplantés dans des hôtes *v* ou des disques *cn* dans des hôtes *cn*, les yeux des transplants ont la couleur rouge des mutants. Les disques *cn* ou *v* transplantés dans des hôtes sauvages forment des yeux de couleur sauvage. Un disque *cn* dans un hôte *v* développe un œil de la couleur des mutants, mais un disque *v* dans un hôte *cn* résulte en un œil de couleur sauvage. Expliquez ces résultats et indiquez les expériences que vous proposez pour éprouver cette explication.

16. Chez *Drosophila*, la mutation autosomale récessive *bw* résulte en un œil brun foncé tandis que la mutation autosomale récessive *st* donne un œil pourpre. Un homozygote pour les deux gènes possède un œil blanc. Nous avons donc les correspondances suivantes entre génotypes et phénotypes :

$st^+\ st^+\ bw^+\ bw^+$ = œil rouge (type sauvage)
$st^+\ st^+\ bw\ bw$ = œil brun
$st\ st\ bw^+\ bw^+$ = œil pourpre
$st\ st\ bw\ bw$ = œil blanc

Construisez une voie de biosynthèse hypothétique montrant comment les produits interagissent et pourquoi les différentes combinaisons de mutants ont des phénotypes différents.

17. Plusieurs mutants sont isolés qui, tous, exigent le composé G pour la croissance. Les intermédiaires A à E du trajet biosynthétique sont connus et chacun est testé pour son aptitude à permettre la croissance de chacun des mutants 1 à 5. Dans le tableau suivant, + indique la croissance et - l'absence de croissance :

	Composé testé					
	A	B	C	D	E	G
Mutant 1	–	–	–	+	–	+
2	–	+	–	+	–	+
3	–	–	–	–	–	+
4	–	+	+	+	–	+
5	+	+	+	+	–	+

a. Quel est l'ordre des composés A à E dans la biosynthèse ?

b. A quelle étape de la biosynthèse chaque mutant est-il bloqué ?

c. Un hétérocaryon formé des doubles mutants 1,3 et 2,4 pourrait-il croître sur un milieu minimum ? Et celui formé de 1,3 et 3,4 ? Et de 1,2 et 2,4 ou de 1,2 et 1,4 ?

18. Chez *Neurospora* (haploïde), supposez que deux gènes participent à la synthèse de la valine. Leurs allèles mutés sont *val-1* et *val-2* et leurs allèles sauvages sont $val\text{-}1^+$ et $val\text{-}2^+$. Ces deux gènes sont localisés sur le même chromosome, et un crossing-over a lieu entre eux en moyenne dans une méiose sur deux.

COURS CENTRAL UNIVERSITAIRE IBAR

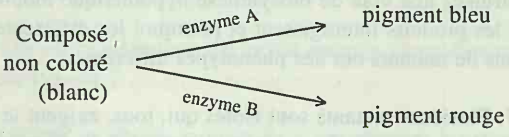
a. Dans quelle proportion des méioses n'y a-t-il pas de crossing-over entre les gènes ?

b. Utilisez la carte de fonction pour déterminer la fréquence de recombinaison entre ces deux gènes.

c. La descendance du croisement *val-1 val-2*$^+$ × *val-1*$^+$ *val-2* est étalée sur un milieu sans valine. Quelle proportion de la descendance sera capable de proliférer ?

d. Les souches *val-1 val-2*$^+$ accumulent le composé intermédiaire B et les souches *val-1*$^+$ *val-2* l'intermédiaire A. Les souches *val-1 val-2*$^+$ croissent sur valine ou A, mais les souches *val-1*$^+$ *val-2* se développent sur valine mais pas sur B. Montrez l'ordre de A et B par rapport à la valine dans la voie biosynthétique, et indiquez quel gène contrôle chaque réaction.

19. Dans une certaine plante, les pétales des fleurs sont normalement pourpres. Deux mutations récessives apparaissent dans des plantes différentes et sont localisées sur des chromosomes différents. La mutation 1 (m_1) fournit des pétales bleus à l'état homozygote (m_1m_1). La mutation 2 (m_2) donne des pétales rouges à l'état homozygote (m_2m_2). Les biochimistes qui travaillent à la synthèse des pigments floraux de cette espèce ont déjà décrit la voie suivante :



a. Quel mutant vous attendez-vous à trouver déficient en l'activité de l'enzyme A ?

b. Une plante a le génotype $M_1m_1M_2m_2$. Quel sera son phénotype ?

c. Si la plante de (**b**) est autofécondée, quelles seront les couleurs de sa descendance et dans quelles proportions ?

d. Pourquoi ces mutations sont-elles récessives ?

20. Chez *Lathyrus odoratus,* la synthèse de l'anthocyane, le pigment pourpre des pétales, est contrôlée par deux gènes, *B* et *D*. La voie biosynthétique est

a. Quelle sera la couleur des pétales d'une lignée pure de la plante incapable de catalyser la première réaction ?

b. Quelle sera la couleur des pétales d'une lignée pure incapable de catalyser la deuxième réaction ?

c. Si les plantes de (a) et (b) sont croisées, quelle couleur auront les pétales des plantes F1 ?

d. Quelles seront les proportions de plantes pourpres, bleues et blanches parmi les plantes F_2 ?

21. Différents couples de mutants *rII* du phage T4 sont testés chez *E. coli* dans les configurations *cis* et *trans*. On compare les nombres moyens de particules de phages produits par bactérie («burst size»). Les résultats obtenus pour six mutants *r* différents, *rU, rV, rW, rX, rY* et *rZ,* sont les suivants :

Génotype *cis*	Nombre de phages produits par bactérie	Génotype *trans*	Nombre de phages produits par bactérie
rU rV / ++	250	*rU* + / + *rV*	258
rW rX / ++	255	*rW* + / + *rX*	252
rY rZ / ++	245	*rY* + / + *rZ*	0
rU rW / ++	260	*rU* + / + *rW*	250
rU rX / ++	270	*rU* + / + *rX*	0
rUr Y / ++	253	*rU* + / + *rY*	0
rU rZ / ++	250	*rU* + / + *rZ*	0
rV rW / ++	270	*rV* + / + *rW*	0
rV rX / ++	263	*rV* + / + *rX*	270
rV rY / ++	240	*rV* + / + *rY*	250
rV rZ / ++	274	*rV* + / + *rZ*	260
rW rY / ++	260	*rW* + / + *rY*	240
rW rZ / ++	250	*rW* + / + *rZ*	255

Si nous assignons *rV* au cistron *A*, quelles sont les localisations des cinq autres mutations rII par rapport aux cistrons *A* et *B* ?

(Le problème 21 provient de Strickberger, *Genetics*. Copyright 1968 by Monroe W. Strickberger. Reproduit avec la permission de Macmillan Publishing Co., Inc.)

22. Il est prouvé qu'occasionnellement pendant la méiose, soit un, soit les deux centromères peuvent se diviser et ségréger précocement à la première plutôt qu'à la deuxième division (comme dans la situation normale). Chez *Neurospora,* les allèles *pan2* produisent une ascospore pâle, les ascospores avortées sont complètement incolores, et les ascospores normales sont noires. Dans un croisement entre deux allèles qui se complémentent, *pan2x* et *pan2y,* quelle proportion d'ascospores noires, pâles et incolores attendez-vous dans les asques qui résultent de la division précoce (**a**) d'un centromère ? (**b**) des deux centromères ? (Supposez que *pan2* est proche du centromère.)

23. *Protozoon mirabilis* est une algue verte unicellulaire haploïde imaginaire qui se tourne vers la lumière grâce à une tache oculaire rouge. En sélectionnant des cellules qui ne se tournent plus vers la lumière, 14 mutants à tache oculaire blanche (*eye*$^-$) sont isolés. Il est possible de fusionner les cellules haploïdes pour obtenir des individus diploïdes. Les 14 mutants *eye*$^-$ sont appariés dans toutes les combinaisons possibles et la couleur de la tache oculaire est notée dans chaque cas. Le tableau 12-8 montre les résultats obtenus ; + indique une tache rouge et - une tache blanche.

a. Le mutant 14 est manifestement différent des autres. En quoi pourrait-il consister ?

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tableau 12-8.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	–	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	–
2	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–
3	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–
4	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–
5	–	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	–
6	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–
7	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–
8	–	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	–
9	–	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	–
10	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–
11	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–
12	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	-	+	–
13	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–
14	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

b. A part le mutant 14, combien de groupes de complémentation y a-t-il et quels mutants figurent dans chaque groupe ?

c. Trois croisements sont effectués et donnent les résultats suivants :

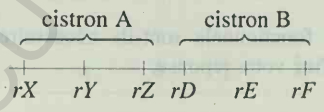
Mutants croisés	Nombre de descendants		
	eye$^+$	*eye*$^-$	Total
1 × 2	31	89	120
2 × 6	5	113	118
1 × 14	0	97	97

Expliquez ces rapports génétiques au moyen de symboles.

d. Combien de loci génétiques interviennent en tout et lesquels des 14 mutants correspondent à chacun de ces loci ?

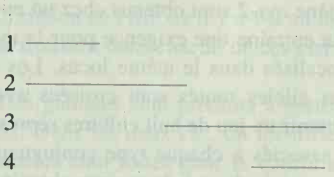
e. Quel est l'arrangement des loci (Dressez une carte) ?

24. Vous disposez de la carte suivante du locus *rII* :



Vous identifiez une nouvelle mutation, *rW* et constatez qu'elle ne complémente avec aucune des mutations des cistrons A ou B. Vous constatez que des recombinants sauvages sont obtenus dans les croisements avec les mutants *rX, rY, rE et rF* mais pas avec *rZ* ou *rD*. Proposez des explications pour ces résultats. Décrivez les tests que vous choisiriez pour faire un choix parmi ces explications.

25. La carte suivante comporte quatre délétions (1 à 4) impliquant le cistron *rIIA* du phage T4 :



Cinq mutations ponctuelles (*a* à *e*) dans *rIIA* sont testées pour leur capacité à donner des recombinants *r*$^+$ dans des croisements avec les mutants porteurs de ces quatre délétions, avec les résultats suivants :

	a	*b*	*c*	*d*	*e*
1	+	+	–	+	+
2	+	+	–	–	–
3	–	–	+	–	+
4	+	–	+	+	+

a. Quel est l'ordre des mutations ponctuelles ?

b. Une autre souche de T4 possède une mutation ponctuelle dans le cistron *rIIB*. Cette souche est mélangée tour à tour avec chacun des mutants portant les délétions dans *rIIA* et les mélanges obtenus sont utilisés pour infecter *E. coli* K à une multiplicité d'infection suffisante pour que chaque cellule-hôte soit infectée par au moins un mutant *rIIA* et un mutant *rIIB*. Une plage de lyse normale est formée avec les délétions 1,2 et 3 mais aucune n'est obtenue avec la délétion 4. Sachant que le cistron B est à droite du cistron A, expliquez le comportement de la délétion 4. Votre explication influence-t-elle votre réponse à (a) ?

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

26. Chez un phage, une série de mutants porteurs de délétions sont croisés par paires. Les résultats suivants sont obtenus (un + indique un croisement qui fournit des recombinants sauvages) :

	1	2	3	4	5
1	–	+	–	+	–
2	+	–	+	+	–
3	–	+	–	–	–
4	+	+	–	–	+
5	–	–	–	+	–

a. Construisez une carte de délétions à partir de cette table.

b. Le premier généticien à effectuer une analyse cartographique par délétion du phage imaginaire SH4 (qui lyse les schmoos) obtint un résultat étonnant :

	1	2	3	4
1	–	–	+	–
2	–	–	–	+
3	+	–	–	–
4	–	+	–	–

Montrez pourquoi il s'agit d'un résultat étonnant en dressant la seule carte de délétions compatible avec ce tableau (Ne vous limitez pas à un raisonnement dicté par les exemples conventionnels.)

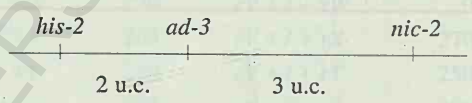
27. Quatre allèles du gène *cys-2* sont obtenus chez un eucaryote haploïde. Chaque allèle entraîne une exigence pour la cystéine et tous les allèles sont localisés dans le même locus. Les quatre souches porteuses de ces allèles mutés sont croisées avec des souches sauvages pour obtenir un jeu de huit cultures représentant les quatre allèles mutés associés à chaque type conjuguant. Les allèles mutés sont ensuite croisés deux à deux pour obtenir toutes les paires possibles. Les produits de la méiose de chaque croisement sont étalés sur un milieu sans cystéine. Dans certains croisements, des prototrophes *cys*$^+$ sont obtenus à faible fréquence. Les résultats sont présentés ci-dessous (les nombres représentent les fréquences de colonies *cys*$^+$ par 10^4 produits méiotiques étalés) :

		Type conjuguant A'			
		1	2	3	4
Type conjuguant A''	1	0	14	2	20
	2	14	0	12	6
	3	2	12	0	18
	4	20	6	18	0

a. Dressez une carte des quatre sites mutés dans le gène *cys-2*. Calculez les distances relatives entre les sites.

b. Voyez-vous une quelconque indication de ce qu'une mutation pourrait intervenir dans la production de prototrophes ?

***28.** Chez *Neurospora*, il existe un gène qui contrôle la production de l'adénine et les mutations de ce gène sont appelées *ad-3*. Le locus *his-2* se trouve à 2 u.c. à gauche, et le locus *nic-2* à 3 u.c. à droite du locus *ad-3* (*his-2* contrôle la synthèse de l'histidine et *nic-2* celle de la nicotinamide). La carte génétique est donc :



Trois auxotrophes *ad-3* différents sont détectés : *ad-3*^{a}, *ad-3*^{b} et *ad-3*^{c} (utilisez *a*, *b* et *c* comme symboles). Les croisements suivants sont effectués :

Croisement 1 : *his-2*$^+$ *a nic-2*$^+$ × *his-2 b nic-2*

Croisement 2 : *his-2*$^+$ *a nic-2* × *his-2 c nic-2*$^+$

Croisement 3 : *his-2 b nic-2* × *his-2*$^+$ *c nic 2*$^+$

Les ascospores sont alors étalées sur un milieu minimum contenant de l'histidine et de la nicotinamide, et les ascospores prototrophes *ad-3*$^+$ sont recueillies. Le tableau 12-9 montre les résultats obtenus. Quels sont l'ordre des mutations *ad-3* et les distances qui les séparent ?

Tableau 12-9.

Génotype des recombinants *ad-3*$^+$	Nombre de spores *ad-3*$^+$ récoltées		
	Croisement 1	Croisement 2	Croisement 3
his-2 nic-2	0	6	0
his-2$^+$ *nic-2*$^+$	0	0	0
his-2 nic-2$^+$	15	0	5
his-2$^+$ *nic-2*	0	0	0
Total des ascospores examinées	41.236	38.421	43.600

29. Chez un organisme diploïde imaginaire, la forme carrée des cellules est due à un effet de seuil tel que la présence de plus de 50 unités de «facteur carré» par cellule entraînera un phénotype «carré», tandis que moins de 50 résultera en un phénotype rond. L'allèle s^f est un gène fonctionnel responsable d'une synthèse importante de facteur carré. Chaque allèle s^f contribue pour 40 unités de facteur carré ; donc un homozygote $s^f s^f$ en possède 80 unités et a le phénotype carré. Un allèle mutant (s^n) apparaît ; il est non fonctionnel et n'entraîne aucune synthèse du facteur carré.

a. Quel allèle sera dominant, s^f ou s^n ?

b. Les allèles fonctionnels sont-ils nécessairement toujours dominants ? Justifiez votre réponse.

c. Dans un système comme celui-ci, comment un allèle spécifique pourrait-il changer au cours de l'évolution de telle sorte que son phénotype montre une transmission récessive à la génération 0 et dominante à une génération ultérieure ?

***30.** Expliquez comment Benzer a pu calculer le nombre de sites où aucune mutation n'apparaissait, comme le montre la figu-

BSU ASTON UNIVERSITY LIBRARY

re 12-35. Supposez, comme le fit Benzer, que les sites où 0, 1 ou 2 mutations se produisent forment un ensemble de sites de mutabilités équivalentes.

31. Chez *Collinsia parviflora,* le pétale est normalement de couleur pourpre. Quatre mutations récessives sont induites, chacune d'entre elles se traduisant par des pétales blancs. Les quatre lignées pures sont ensuite croisées dans les combinaisons indiquées et donnent les résultats suivants :

Mutants croisés	F_1	F_2
1 × 2	tous pourpres	1/2 pourpres, 1/2 blancs
1 × 3	tous pourpres	9/16 pourpres, 7/16 blancs
1 × 4	tous blancs	tous blancs

a. Expliquez tous les résultats en utilisant des schémas chaque fois que c'est possible.

b. Quelles F_1 et F_2 prévoyez-vous pour les croisements 2 × 3 et 2 × 4 ?

***32.** Un biologiste est intéressé par le contrôle génétique de la synthèse de la leucine chez le champignon filamenteux haploïde *Aspergillus.* Il traite les spores au moyen d'un agent mutagène et obtient cinq mutations ponctuelles (*a* à *e*), qui se traduisent par une auxotrophie pour la leucine. Il commence par construire des hétérocaryons entre ces mutations pour déterminer leurs relations fonctionnelles. Il obtient les résultats suivants où + indique que l'hétérocaryon est capable de croître et – indique que l'hétérocaryon est incapable de croître sur un milieu sans leucine :

	a	*b*	*c*	*d*	*e*
a	–	+	+	+	–
b		–	+	+	+
c			–	+	+
d				–	+
e					–

Le biologiste croise ensuite ces mutations dans toutes les combinaisons possibles. Après chaque croisement, il teste 500 ascospores de la descendance en les inoculant sur un milieu sans leucine. Les résultats sont les suivants (les chiffres représentent le nombre de prototrophes pour la leucine pour une descendance de 500 individus) :

	a	*b*	*c*	*d*	*e*
a	0	125	128	126	0
b		0	124	2*	125
c			0	124	127
d				0	123
e					0

Expliquez génétiquement les deux ensembles de données. (*Notez qu'il a été vérifié que les deux prototrophes pour la leucine obtenus dans le croisement *b* × *d* ne sont pas dus à des réversions.)

33. Chez *Drosophila*, le phénotype «star» de l'œil est provoqué par des mutations récessives localisées en un seul endroit du deuxième chromosome. Cette région est flanquée à gauche par le locus *A* (allèle *A* ou *a*) et à droite par le locus *B* (allèle *B* ou *b*) :

Six mutations *star* induites indépendamment sont rendues homozygotes avec les constitutions *AABB* et *aabb*, et sont croisées entre elles pour étudier la complémentation au locus *star.* Les résultats suivants sont obtenus où + indique un œil sauvage et *s* un œil «star», deux phénotypes du stade F_1) :

	AAssBB					
aassbb	1	2	3	4	5	6
1	*s*	+	*s*	*s*	+	[+]
2		*s*	+	[+]	*s*	+
3			*s*	*s*	+	+
4				*s*	+	+
5					*s*	+
6						*s*

a. Combien de cistrons il y a-t-il au locus *star,* et quelles mutations se trouvent dans chacun de ces cistrons ?

b. Des gamètes sont produits à partir des hétérozygotes entre crochets. Dans les deux cas, on identifie des recombinants *star*$^+$. Les gamètes sont testés pour la conformation du marqueur flanquant qui est *aB* dans l'hétérozygote 1 × 6 aussi bien que dans l'hétérozygote 2 × 4. Déterminez l'ordre des cistrons par rapport aux loci *Aa* et *Bb.*

34. En 1934, en Norvège, la mère de deux enfants retardés mentalement s'adressa au médecin Asbjørn Følling et l'informa de ce que l'urine de ses enfants avait une odeur curieuse. Il soumit l'urine à un test au chlorure ferrique et constata qu'alors que l'urine normale donne une couleur brune celle des enfants se colorait en vert. Il en déduisit que la substance chimique responsable de la coloration était l'acide phénylpyruvique. Etant donné la similitude de cette substance avec la phénylalanine, il apparut vraisemblable qu'elle avait été formée à partir de celle-ci dans le sang mais il n'existait aucun test pour la phénylalanine. Toutefois une certaine bactérie était capable de convertir la phénylalanine en acide phénylpyruvique et permettait donc de mesurer la phénylalanine par le test au chlorure ferrique. On constata que le sang des enfants contenait effectivement un niveau élevé de phénylalanine qui était probablement la source de l'acide phénylpyruvique. Følling nota qu'en général dans les familles qui comportaient des enfants retardés dont l'urine se colorait en vert en présence de chlorure ferrique la proportion d'enfants atteints était d'1/4 pour 3/4 d'enfants normaux. Cette maladie, qui fut appelée la phénylcétonurie (PCU), semblait avoir une base génétique et était transmise comme un caractère mendélien récessif unique.

BCU Lausanne / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Il devint évident que la phénylalanine était la coupable et que cette substance s'accumulait chez les malades atteints de PCU et était ensuite convertie en des quantités élevées d'acide phénylpyruvique qui interféraient avec le développement normal des tissus nerveux. Ceci conduisit à l'élaboration d'un régime spécial sans phénylalanine qu'on appliqua aux nouveaux-nés souffrant de PCU et qui permit au développement normal de se poursuivre sans retard mental. On constata en effet qu'une fois le système nerveux central de l'enfant développé, celui-ci pouvait se passer du régime spécial. Mais on constata que les femmes atteintes de PCU qui s'était développées normalement grâce au régime spécial mettaient au monde des bébés retardés mentalement sur lesquels le régime spécial n'avait aucun effet.

a. Pourquoi, croyez-vous, les bébés de mères atteintes de PCU naissaient-ils retardés mentaux ?

b. Expliquez les différences de résultats obtenus pour les bébés PCU et les bébés de mères PCU.

c. Proposez un traitement qui permette aux mères PCU d'avoir des enfants qui ne soient pas atteints de la maladie

d. Rédigez une brève dissertation sur la PCU qui intègre les concepts impliqués aux niveaux de la génétique, du diagnostic, des enzymes, de la physiologie, de la généalogie et des populations.

Décomposons le problème

a. Dressez la généalogie de la famille norvégienne en remontant le plus haut possible. Croyez-vous que certains frères et soeurs auraient pu ne pas être atteints ?

b. Les enfants présentés initialement chez Følling (supposons qu'ils avaient 10 ans) auraient-ils pu tirer bénéfice du régime spécial s'il leur avait été appliqué à partir de cet âge ?

c. Pourquoi la bactérie était-elle nécessaire pour Følling ?

d. Pourquoi le test sanguin était-il jugé important ?

e. Pourquoi il y a-t-il de l'acide phénylpyruvique dans l'urine ?

f. Quelle est la relation attendue entre les concentrations dans le sang et dans l'urine ?

g. La substance verte formée dans le test au chlorure ferrique était-elle importante en soi ?

h. Quelles concentrations de phénylalanine et d'acide phénylpyruvique sont-elles attendues dans le sang et l'urine d'enfants normaux ?

i. Quelle était l'origine de l'odeur de l'urine des enfants ?

j. Quels étaient les génotypes des parents ?

k. Les familles dont les parents ont de tels génotypes peuvent-elles être fréquentes ?

l. Quels sont les génotypes attendus pour les descendants et dans quelles proportions ?

m. Quels seraient les génotypes des parents dans la plupart des familles de la population ?

n. Pourqoi a-t-on conclu que la maladie était héréditaire ?

o. Pourquoi a-t-on conclu que la maladie était transmise comme un caractère mendélien récessif ?

p. A quel stade(s) du développement la majorité du système nerveux est-elle formée ?

q. Pourquoi croyait-on que les adultes atteints de PCU n'exigeaient plus de régime spéciale ?

r. Quels sont les volumes relatifs des systèmes sanguins de la mère et du fœtus ?

s. Quels sont les agents capables de traverser la barrière du placenta (cellules, macromolécules, petites molécules) ?

t. Quelle substance associée à la PCU pourrait être transmise à la mère par l'enfant ? Ou à l'enfant par la mère ?

u. Qu'est-ce qu'un acide aminé essentiel ?

v. La phénylalanine est-elle un acide aminé essentiel ?

w. En quoi la PCU est-elle une illustration du concept un gène–une enzyme ?

x. Pourquoi la PCU est-elle récessive ?

y. Quel rapport existe-t-il entre les trajets métaboliques et la PCU ?

z. Dans ce chapitre, trouvez un diagramme qui montre le rapport des substances chimiques associées à la PCU avec la chimie cellulaire ?

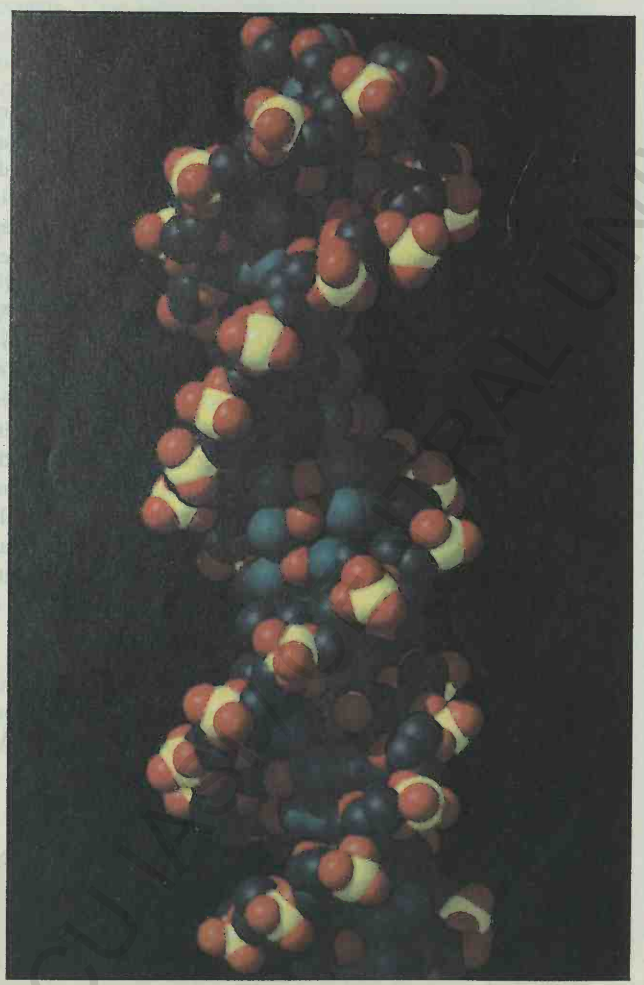
aa. Dressez un diagramme qui met en relation les chromosomes, les gènes, les sites de mutation, les ARNm, les enzymes, les substrats et les produits chez les individus normaux et chez les malades de la PCU.

BU/ISI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

13

La fonction de l'ADN



Modèle par ordinateur de l'ADN. (J. Newdol, Computer Graphics Laboratory, University of California, San Francisco. Copyright © Regents, University of California.)

CONCEPTS-CLÉS

- L'ADN est transcrit en une molécule d'ARN messager qui est ensuite traduite au cours de la synthèse des protéines.
- La traduction nécessite des ARN de transfert et des ribosomes.
- Le code génétique est un code à triplets sans chevauchement.
- Des séquences spéciales annoncent l'initiation et la terminaison de la transcription aussi bien que de la traduction.
- Chez les eucaryotes, l'ARN produit initialement au cours de la transcription est l'objet de différentes formes de maturation avant de fournir l'ARN messager final.
- Beaucoup de gènes eucaryotiques contiennent des segments d'ADN appelés *introns* qui interrompent la séquence codante du gène.
- Le transcrit eucaryotique primaire est excisé de diverses manières pour éliminer l'ARN codé par l'intron et produire l'ARN messager final.

BOSTON UNIVERSITY LIBRARY

L'information génétique contenue dans l'ADN peut être recopiée au cours de la réplication pour produire davantage d'ADN ou être traduite en protéine. Tels sont les processus de **transfert d'information** qui constituent les fonctions de l'ADN. Nous avons considéré la réplication en détail au chapitre 11. Examinons maintenant la manière dont l'information est transformée en protéine. Une partie seulement de ce mécanisme fut élucidée par une analyse purement génétique ; les mutants furent évidemment utiles mais seulement pour faciliter le travail biochimique. Néanmoins, le type de raisonnement employé par les biologistes moléculaires pour étudier cet aspect de la fonction de l'ADN illustre un mode d'approche qui est caractéristique de l'analyse génétique.

Nous verrons dans ce chapitre que les premiers indices de la manière dont l'ADN régit la synthèse des protéines furent obtenus grâce à l'étude des bactériophages, où l'on montra que l'expression des gènes consiste en la synthèse de molécules d'ARN à partir de matrices d'ADN, un processus qui fut appelé la **transcription.** L'ARN est synthétisé d'après un seul des deux brins d'une hélice d'ADN bicaténaire. Cette transcription est catalysée par une enzyme, l'**ARN polymérase**, selon des règles analogues à celles de la réplication. L'ARN présente des similitudes avec l'ADN, bien que le sucre présent dans l'ARN soit le ribose et que l'uracile y remplace la thymine. L'ARN présent dans une cellule se partage entre plusieurs variétés : les ARN de transfert, les ARN ribosomiques, les ARN messagers et de faibles quantités d'autres ARN de petites tailles. Les trois tailles d'**ARN ribosomiques (ARNr)** se combinent avec toute une série de protéines spécifiques pour former les **ribosomes** qui sont les machines responsables de la synthèse protéique. La synthèse d'un polypeptide effectuée par un ribosome d'après une molécule d'ARN messager est appelée la **traduction.** Les **ARN de transfert (ARNt)** constituent un groupe de molécules relativement petites dont chacune est spécifique d'un acide aminé déterminé ; elles transportent les acides aminés vers les ribosomes où ils sont ajoutés aux polypeptides en croissance.

Les molécules d'**ARN messager (ARNm)**, qui sont synthétisées sur base d'une matrice d'ADN, contiennent une information qui est traduite en protéines. La séquence de bases de l'ARNm détermine la séquence des acides aminés de la protéine. Nous verrons comment ceci est réalisé et comment ce **code génétique** a pu être déchiffré. Nous verrons en outre comment certaines séquences signalent l'emplacement des sites d'initiation et de terminaison de la transcription et de la traduction. Chez les eucaryotes, beaucoup de molécules d'ARNm subissent, avant d'être traduites, une maturation qui ajoute certaines particularités au mécanisme de transfert de l'information.

La transcription

Les premiers chercheurs qui s'intéressèrent au transfert de l'information avaient une bonne raison de croire qu'elle n'était pas transmise directement de l'ADN aux protéines. C'est que l'ADN se trouve dans le noyau (d'une cellule eucaryotique) alors que les protéines sont synthétisées dans le cytoplasme. Un autre acide nucléique, l'acide ribonucléique (ARN) joue en effet le rôle d'intermédiaire. (Note des traducteurs : Ce rôle de l'ARN fut suggéré dès 1951 par Jean Brachet en Belgique et Torbjörn Caspersson en Suède, qui montrèrent par des expériences cytochimiques qu'il existe, pour un tissu déterminé, une corrélation entre la quantité d'ARN et l'activité de synthèse des protéines. Ces observations, les premières à impliquer les ARN dans la synthèse des protéines, furent à l'origine d'un grand nombre de travaux sur le rôle des ARN).

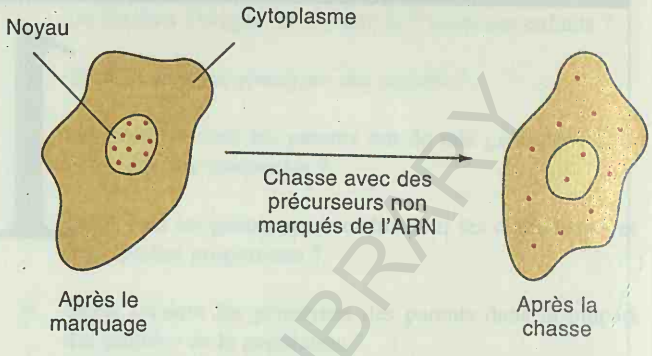


Figure 13-1. L'ARN synthétisé pendant une courte période de temps est soumis à un bref «marquage» en présence de précurseurs radioactifs de l'ARN, suivi d'une «chasse» par des précurseurs non radioactifs. Dans une autoradiographie, l'ARN marqué apparaît sous forme de grains noirs. Apparemment, l'ARN est synthétisé dans le noyau et migre ensuite vers le cytoplasme.

Les premières expériences suggérant un ARN intermédiaire

Lorsque des cellules sont cultivées en présence de précurseurs radioactifs de l'ARN, la radioactivité apparaît tout d'abord dans le noyau, ce qui indique que c'est là que se déroule la synthèse de cet ARN. Dans une expérience de **marquage avec chasse**, on réalise un court marquage («pulse») au moyen de précurseurs marqués qui sont incorporés dans les molécules d'ARN. Les cellules sont ensuite transférées dans un milieu contenant des précurseurs non marqués. Ceci aboutit à la chasse («chase») du marquage de l'ARN puisque, lorsque l'ARN est dégradé, seuls des précurseurs non marqués sont utilisés pour synthétiser de nouvelles molécules d'ARN. Les expériences de marquage avec chasse permettent de suivre au cours du temps une population de molécules d'ARN synthétisées pratiquement simultanément. Au moment du marquage, la radioactivité se trouve uniquement dans le noyau. Dans les échantillons prélevés après la chasse, l'ARN marqué est localisé dans le cytoplasme (figure 13-1). Il semble donc que l'ARN soit synthétisé dans le noyau et migre ensuite vers le cytoplasme où les protéines sont synthétisées. C'est donc un bon candidat pour jouer le rôle d'un intermédiaire qui transmet l'information de l'ADN aux protéines.

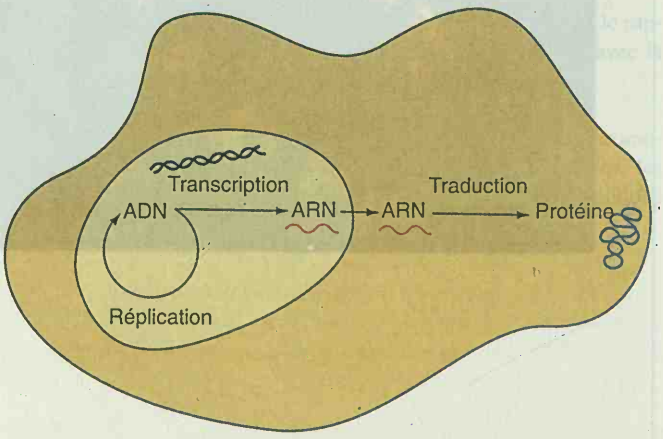


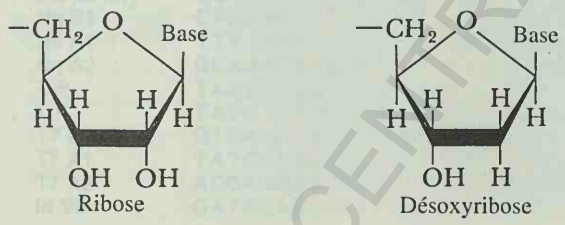
Figure 13-2. Les trois étapes du transfert de l'information : la réplication, la transcription et la traduction.

En 1957, Elliot Volkin et Lawrence Astrachan firent une observation importante. Ils constatèrent qu'un des événements moléculaires les plus significatifs qui suivent l'infection d'*E. coli* par le bactériophage T2 est une bouffée de synthèse d'ARN. En outre, cet ARN induit par le phage subit une «rotation» rapide ainsi que le montre l'expérience suivante. Les bactéries infectées sont d'abord marquées à l'uracile radioactif (un précurseur spécifique de l'ARN radioactif), puis soumises à une chasse en présence d'uracile froid. L'ARN isolé peu après le marquage est radioactif mais celui que l'on récupère un peu plus tard, après la chasse, n'est pas marqué, ce qui montre que l'ARN a un temps de demi-vie très court. Enfin, lorsque les contenus en nucléotides des ADN d' *E. coli* et du phage T2 sont comparés avec celui de l'ARN induit par le phage, on constate que le contenu de ce dernier est très proche de celui de l'ADN de phage.

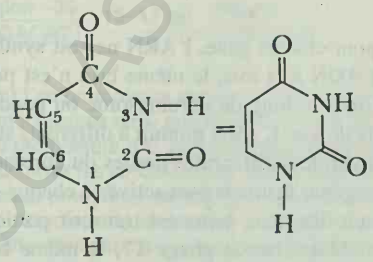
La conclusion provisoire des deux expériences décrites ci-dessus était que l'ARN était synthétisé à partir de l'ADN et était ensuite d'une manière ou l'autre utilisé pour la synthèse des protéines. (Note des traducteurs : Dans le cadre conceptuel élaboré par François Jacob et Jacques Monod, cet ARN devait devenir le «messager», c'est-à-dire la «matrice» qui fixe l'ordre des acides aminés dans les protéines). Nous pouvons donc distinguer trois étapes dans le transfert de l'information (figure 13-2) : la *réplication* (la synthèse de l'ADN), la *transcription* (la synthèse de la copie d'ARN d'une portion de l'ADN), et la *traduction* (la synthèse d'un polypeptide dictée par la séquence de l'ARN).

Les propriétés de l'ARN

Bien que l'ARN soit un acide nucléique à longue chaîne comme l'ADN, il possède des propriétés très différentes. Primo, l'ARN ne comporte qu'un seul brin ; ce n'est pas une double hélice. Secundo, l'ARN comporte du ribose au lieu de désoxyribose dans ses nucléotides (d'où son nom d'acide ribonucléique) :



Tertio, l'ARN contient une autre base pyrimidique, l'**uracile** (abréviation U) au lieu de thymine. Néanmoins, l'uracile forme des liens hydrogène avec l'adénine, exactement comme la thymine :



Uracile

Personne ne sait exactement pourquoi l'ARN contient de l'uracile au lieu de thymine ou du ribose à la place du désoxyribose. La particularité principale de l'ARN est de ne comporter habituellement qu'un seul brin mais, pour le reste, sa structure est très proche de celle de l'ADN.

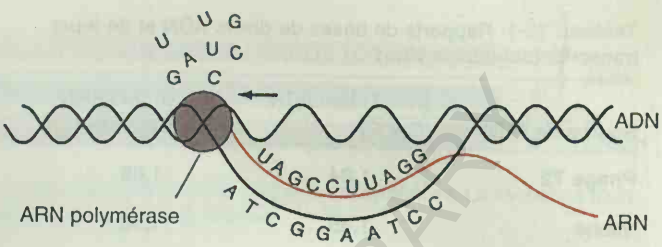


Figure 13-3. Synthèse de l'ARN sur une matrice d'ADN à simple brin à partir de nucléotides libres. Le processus est catalysé par l'ARN polymérase. L'uracile (U) s'apparie avec l'adénine (A).

Complémentarité et asymétrie dans la synthèse de l'ARN.

Les similitudes de l'ADN et de l'ARN suggèrent que la transcription est fondée sur la complémentarité des bases, qui est aussi la clé de la réplication de l'ADN. Une enzyme de transcription, l'ARN polymérase, effectue la transcription d'une manière qui ressemble beaucoup à la réplication (figure 13-3).

Ce modèle de transcription est confirmé par les données cytologiques (figure 13-4). Le fait que l'ARN puisse être synthétisé avec l'ADN comme matrice est également démontré par la synthèse in vitro de l'ARN à partir des nucléotides en présence d'ADN et d'une ARN polymérase extractible. Quelle que soit la source de l'ADN utilisé, l'ARN synthétisé possède un rapport (A

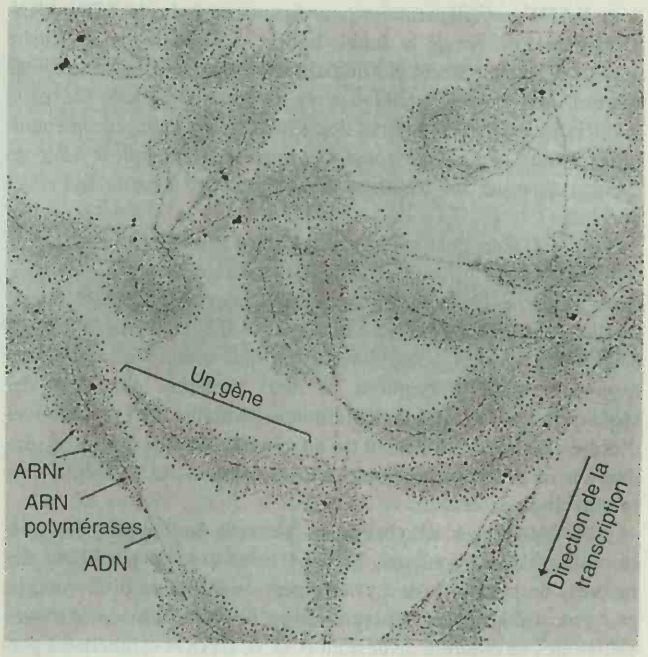


Figure 13-4. Gènes d'ARN ribosomiques (ARNr) répétés en tandem au cours de leur transcription dans le nucléole de *Triturus viridiscens*, un amphibien. (L'ARNr est un constituant du ribosome, un organite cellulaire). De nombreuses molécules d'ARN polymérase sont attachées le long de chaque gène, et effectuent la transcription dans la même direction. Les molécules d'ARN en cours de synthèse apparaissent comme des fils qui s'écartent du filament d'ADN. Les molécules d'ARN les plus courtes sont au début de la transcription ; les plus longues sont presque complètes. D'où l'aspect d'«arbre de Noël» (Photographie par O. L. Miller, Jr., et Barbara A. Hamkalo).

BCU LAUSANNE CENTRALE UNIVERSITY LIBRARY

Tableau 13-1. Rapports de bases de divers ADN et de leurs transcrits (obtenus in vitro)

Source de l'ADN	$\frac{(A + T) \text{ de l'ADN}}{(G + C)}$	$\frac{(A + U) \text{ de l'ARN}}{(G + C)}$
Phage T2	1,84	1,86
Vache	1,35	1,40
Micrococcus (bactérie)	0,39	0,49

+ U)/(G + C) analogue au rapport (A + T)/(G + C) de l'ADN (tableau 13-1). Cette expérience n'indique pas si l'ARN est synthétisé à partir des deux brins de l'ADN ou à partir d'un seul, mais elle montre que la fréquence des paires A-T (par rapport aux paires G-C) dans la séquence de l'ADN se reflète exactement dans le contenu d'(A + U) dans l'ARN (ces relations sont difficiles à saisir sans faire de schéma ; le problème 2 à la fin de ce chapitre fournit l'occasion de préciser ces notions).

Pour vérifier la complémentarité de l'ADN et de l'ARN, les expérimentateurs peuvent exploiter la spécificité et la précision de l'hybridation des acides nucléiques. L'ADN peut être dénaturé et mélangé avec l'ARN pour lequel il a servi de matrice. Au cours d'un refroidissement lent, une partie des brins d'ARN s'apparie avec l'ADN complémentaire pour former un hybride ADN-ARN. Cet hybride diffère de la double hélice ADN-ADN par sa densité et peut donc être décelé par une ultracentrifugation en chlorure de césium. Les acides nucléiques ne peuvent s'associer de cette manière que s'ils contiennent des séquences de bases complémentaires ; cette expérience constitue donc la preuve que l'ARN du transcrit possède une séquence complémentaire de celle de l'ADN parental.

Pouvons-nous déterminer si l'ARN est synthétisé à partir d'un seul ou des deux brins de l'ADN ? Il semble raisonnable de considérer qu'un seul brin est utilisé puisque la synthèse d'ARN à partir des deux brins produirait à partir du même segment d'ADN deux brins d'ARN complémentaires qui seraient probablement responsables de la synthèse de deux protéines possédant des séquences d'acides aminés différentes. En réalité, diverses preuves d'ordre chimique confirment qu'en général la transcription se produit sur un seul brin mais pas nécessairement sur le même pour tout le chromosome.

Les expériences d'hybridation peuvent être appliquées à la résolution de ce problème. Si deux brins d'ADN possèdent des rapports de purines et de pyrimidines sensiblement différents, ils peuvent aisément être séparés puisqu'ils possèdent des densités différentes en chlorure de césium (CsCl). L'ARN synthétisé à partir d'un segment d'ADN peut donc être purifié et hybridé séparément avec chacun des brins pour voir s'il n'est complémentaire que d'un seul de ces brins. J. Marmur et ses collaborateurs réussirent à séparer les brins de l'ADN du phage SP8 de *B. subtilis*. Ils dénaturèrent l'ADN, le refroidirent rapidement pour éviter sa renaturation et séparèrent ensuite les brins dans le CsCl. Ils montrèrent que l'ARN de SP8 ne s'hybride qu'avec un seul des deux brins, ce qui prouve que la transcription est **asymétrique**—c'est-à-dire ne s'effectue que sur un seul brin d'ADN.

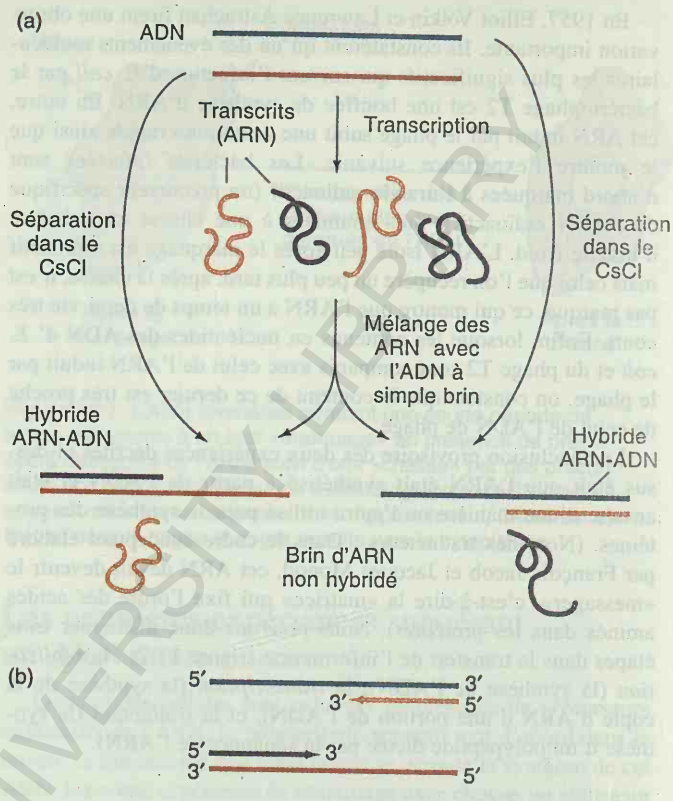


Figure 13-5. (a) L'hybridation ADN-ARN démontre que chaque transcrit d'ARN n'est complémentaire que d'un seul brin de l'ADN parental. Dans cet exemple, chacun des deux brins d'ADN est transcrit mais la transcription est asymétrique—un seul brin est transcrit pour chaque région particulière. (b) Carte de ce génome hypothétique montrant la direction de la transcription pour les transcrits formés à partir des brins opposés de l'ADN.

Bien que, pour chaque gène, l'ARN ne soit synthétisé que sur un seul brin d'ADN à la fois, le même brin n'est pas nécessairement transcrit tout le long du chromosome ou pendant toutes les phases du cycle de vie. L'ARN produit à différents stades du cycle d'un phage s'hybride à différentes parties du chromosome, ce qui montre que des gènes distincts sont activés à chaque stade. Chez le phage λ, chacun des deux brins est transcrit partiellement à un stade différent. Mais chez le phage T7, le même brin est utilisé pour la transcription des gènes précoces et des gènes tardifs. La figure 13-6 montre une séquence d'ARN synthétisée à partir du brin matrice de l'ADN. Le brin matrice de l'ADN pour un ARNm donné est appelé le **brin sens.** Le brin d'ADN complémentaire est appelé le **brin antisens.** Notez que l'ARNm a la même séquence que le brin antisens (avec des U en place deT).

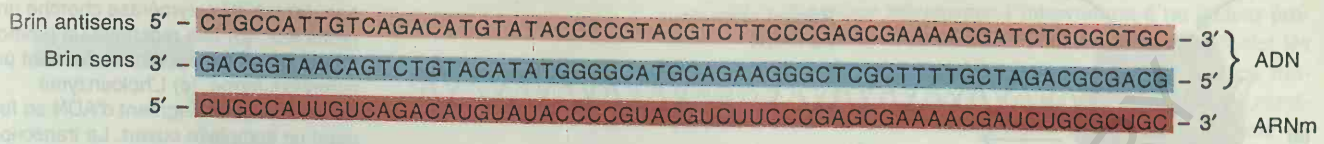


Figure 13-6. La séquence de l'ARNm est complémentaire de celle du brin matrice de l'ADN à partir duquel il est synthétisé. La séquence montrée ici fait partie du gène de la β-galactosidase, une enzyme impliquée dans le métabolisme du lactose.

L'ARN polymérase

Chez la plupart des procaryotes, une ARN polymérase unique transcrit tous les types d'ARN. La figure 13-7 montre la structure de l'ARN polymérase d'*E. coli*.. Nous voyons que l'enzyme comporte quatre types de sous-unités différentes. La sous-unité béta (β) a un poids moléculaire de 150.000 daltons, béta prime (β') de 160.000, alfa (α) de 40.000 et sigma (σ) de 70.000. La sous-unité σ peut se dissocier du reste du complexe en libérant le **noyau de l'enzyme**. L'enzyme complète avec sa sous-unité σ est appelée l'**holoenzyme de l'ARN polymérase** ; elle est nécessaire pour une initiation correcte de la transcription, alors que le noyau de l'enzyme peut poursuivre une transcription déjà initiée mais est incapable à lui seul d'entamer la transcription aux endroits convenables.

Examinons maintenant les trois étapes de la transcrition : l'**initiation**, l'**élongation** et la **terminaison**.

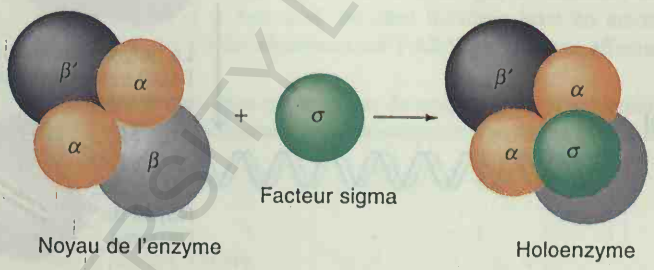


Figure 13-7. La structure de l'ARN polymérase. Le noyau de l'enzyme comporte deux polypeptides α, un polypeptide β et un polypeptide β'. L'addition de la sous-unité σ permet l'initiation aux sites promoteurs. (Nous discuterons des promoteurs dans la section suivante).

(a) Promoteurs forts d'*E. coli*

tyr tRNA	TCTCAACGTAACACTTTACAGCGGCG	CGTCATTTGATATGATGC GCCCCGCTTCCCGATAAGGG
rrn D1	GATCAAAAAAATACTTGTGCAAAAAA	TTGGGATCCCTATAATGCGCCTCCGTTGAGACGACAACG
rrn X1	ATGCATTTTTCCGCTTGTCTTCCTGA	GCCGACTCCCTATAATGCGCCTCCATCGACACGGCGGAT
rrn $(DXE)_2$	CCTGAAATTCAGGGTTGACTCTGAAA	GAGGAAAGCGTAATATAC GCCACCTCGCGACAGTGAGC
rrn E1	CTGCAATTTTTCTATTGCGGCCTGCG	GAGAACTCCCTATAATGCGCCTCCATCGACACGGCGGAT
rrn A1	TTTTAAATTTCCTCTTGTCAGGCCGG	AATAACTCCCTATAATGCGCCACCACTGACACGGAACAA
rrn A2	GCAAAAATAAATGCTTGACTCTGTAG	CGGGAAGGCGTATTATGC ACACCCCGCGCCGCTGAGAA
λ P_R	TAACACCGTGCGTGTTGACTATTTTA	CCTCTGGCGGTGATAATGG TTGCATGTACTAAGGAGGT
λ P_L	TATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATA	CCACTGGCGGTGATACTGA GCACATCAGCAGGACGCAC
T7 A3	GTGAAACAAAACGGTTGACAACATGA	AGTAAACACGGTACGATGT ACCACATGAAACGACAGTGA
T7 A1	TATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGT	CTAACCTATAGGATACTTA CAGCCATCGAGAGGGACACG
T7 A2	ACGAAAAACAGGTATTGACAACATGAAGTAACATGCAGTAAGATAC AAATCGCTAGGTAACACTAG
fd VIII	GATACAAATCTCCGTTGTACTTTGTT	TCGCGCTTGGTATAATCG CTGGGGGTCAAAGATGAGTG
	−35	−10 +1

(b) Séquences consensus des promoteurs

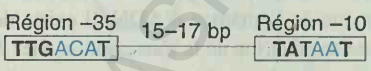


Figure 13-8. (a) Les promoteurs comportent des régions dont les séquences sont similaires ainsi que le montrent les régions colorées en jaune de 13 promoteurs d'*E. coli*. Des espaces (points) sont inclus pour maximiser les similitudes de séquences. Le gène commandé par chaque promoteur est indiqué à la gauche de la figure. La numérotation correspond au nombre de bases en amont (–) ou en aval (+) du site d'initiation de la synthèse de l'ARN (+1). (b) Le code des couleurs utilisé pour les séquences consensus montrées au bas de la figure est le suivant : lettres bleues, > 75% ; lettres noires (caractères gras), 50-75% ; lettres noires, 40-50 %. [De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par W. H. Freeman and Company. Voir W. R. Mc Clure, Ann. Rev. Biochem. 54, 1985, 171 (Séquences consensus).]

L'initiation

Les régions de l'ADN qui signalent le début de la transcription sont appelées **promoteurs** (Nous envisagerons leur rôle dans le contrôle de l'expression des gènes au chapitre 18). La figure 13-8 montre les séquences des promoteurs correspondants à 12 sites d'initiation de transcription différents du génome d'*E. coli*. Les bases sont alignées d'après les similitudes de séquences présentes immédiatement en amont de la première base transcrite (désignée comme le «site d'initiation» dans la figure 13-8).

Notez que, dans la figure 13-8, deux régions d'homologie apparaissent dans pratiquement tous les cas. Elles sont désignées comme les régions –35 et –10 d'après leurs localisations par rapport au site d'initiation de la transcription. Au bas de la figure 13-8 se trouve indiquée la séquence idéale ou «consensus» d'un promoteur. La démonstration physique que l'ARN polymérase établit un contact avec ces deux régions lorsqu'elle se lie à l'ADN a été

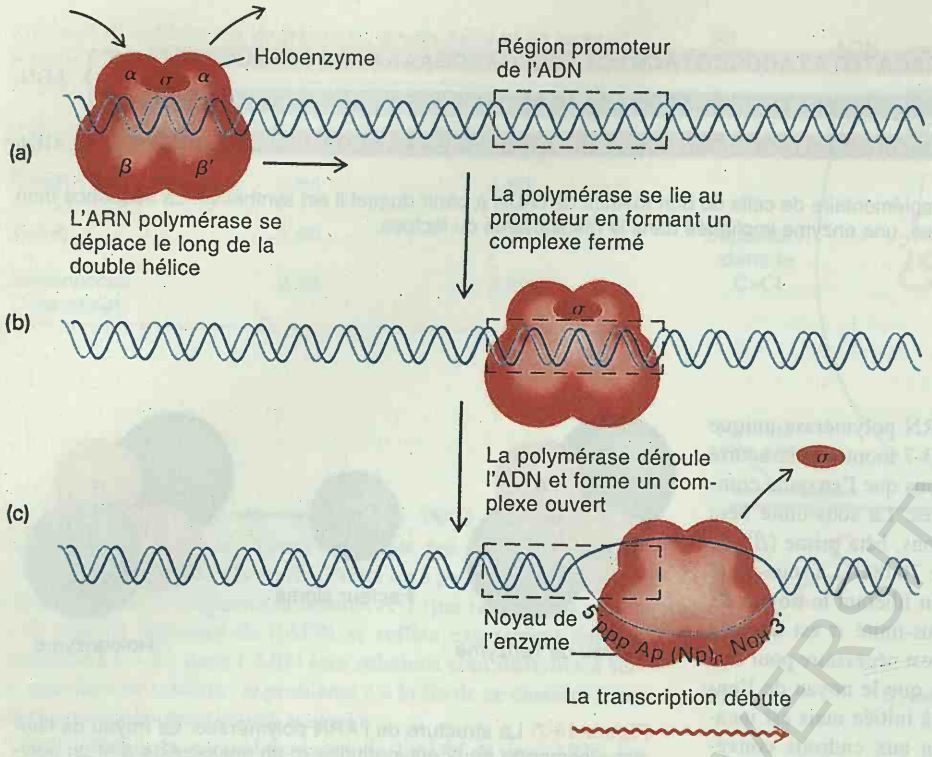


Figure 13-9. L'initiation de la transcription. (a) L'ARN polymérase cherche un promoteur. (b) Elle reconnaît un promoteur et s'y lie étroitement en formant un complexe fermé. (c) L'holoenzyme déroule un court segment d'ADN en formant un complexe ouvert. La transcription débute et le facteur σ est libéré. Le transcrit d'ARN est montré ; il commence par un adénosine triphosphate (pppA), comporte ensuite un nombre indéterminé de nucléotides $[(Np)_n]$ et se termine par NOH. (Modifié d'après J. Darnell, H. Lodish et D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*, 2ième éd. Copyright ©1990 by Scientific American Books, Inc.)

réalisée. L'enzyme déroule ensuite la molécule d'ADN et commence à synthétiser une molécule d'ARN.

La sous-unité dissociable de l'ARN polymérase, le facteur σ, permet à cette polymérase de reconnaître et de se lier spécifiquement aux promoteurs. Tout d'abord, l'holoenzyme cherche le promoteur (figure 13-9a) et, dans un premier temps, s'y lie de manière relativement lâche en reconnaissant les régions –35 et –10. La structure qui en résulte est un *complexe fermé au promoteur* (voir la figure13-9b). Ensuite, l'enzyme se lie plus solidement et sépare les bases au voisinage de la région –10. Une fois que la polymérase liée a provoqué cette dénaturation locale, on dit qu'un *complexe ouvert au promoteur* s'est formé (figure 13-9c). Cette étape d'initiation conduisant à la formation d'un complexe ouvert exige le facteur sigma.

L'élongation

Peu après avoir initié la transcription, le facteur sigma se dissocie de l'ARN polymérase. L'ARN est toujours synthétisé dans la direction 5' vers 3' (figures 13-10 et 13-11), les nucléosides triphosphates (NTP) agissant comme les substrats de l'enzyme. L'équation qui suit représente l'addition des divers nucléotides.

$$\text{NTP} + (\text{NMP})_n \xrightarrow[\substack{Mg^{2+}\\ \text{ARN}\\ \text{polymérase}}]{\text{ADN}} (\text{NMP})_{n+1} + \text{PP}_i$$

L'énergie exigée par la réaction est dérivée du clivage du triphosphate à haute énergie en monophosphate avec libération de diphosphate inorganique (PP_i), comme le montre la figure 13-10. La figure 13-11 montre une représentation physique de l'élongation. Remarquez qu'une «bulle de transcription» doit se former puisque la transcription s'effectue sur une matrice bicaténaire. Cette bulle doit se déplacer le long du duplex d'ADN au cours de l'élongation. Certaines séquences peuvent provoquer des ralentissements ou des arrêts qui sont cruciaux pour la terminaison de la transcription (voir plus loin).

La terminaison

L'ARN polymérase reconnaît également des signaux de terminaison de chaîne, un processus qui correspond au détachement de l'ARN naissant et de l'enzyme de la matrice d'ADN. Il existe deux mécanismes principaux de terminaison de la transcription chez *E. coli.*

Dans le premier mécanisme, la terminaison est directe. Les séquences des terminateurs comportent environ 40 pb et finissent par un segment riche en GC suivi de six A, ou plus, sur le brin matrice. Dans la séquence correspondante de l'ARN, ce segment riche en GC s'organise de telle sorte que le transcrit, dans cette région, se replie *sur lui-même* grâce à la complémentarité des bases, comme le montre la figure 13-12. La section d'ARN à double brin qui en résulte est appelée une **boucle en épingle à cheveux.** Elle est suivie d'une série d'U qui correspondent aux résidus A présents dans la matrice d'ADN. La boucle en épingle à cheveux et la succession de résidus U semblent servir de signal de libération de l'ARN polymérase et de terminaison de la transcription.

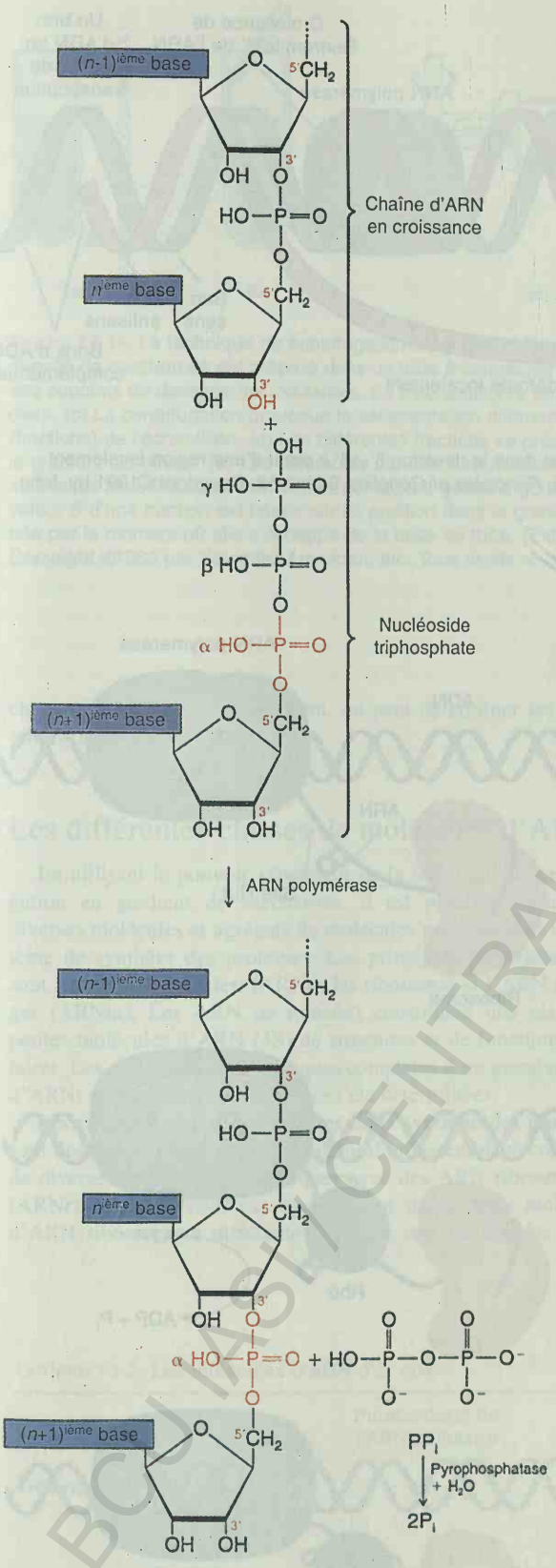


Figure 13-10. Les additions des nucléotides ont lieu une à la fois dans la direction 5' vers 3'. La chaîne s'allonge par la formation d'une liaison entre l'extrémité 3' hydroxyle du brin en croissance et un nucléoside triphosphate, avec libération d'un ion pyrophosphate (PP_i). Ceci conduit à l'addition d'un phosphate, qui est incorporé dans le squelette du nouveau brin. L'ADN croît par des réactions avec des désoxyribonucléosides triphosphates, et l'ARN par des réactions avec des ribonucléosides triphosphates. (Modifié d'après H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

Dans le deuxième mécanisme, l'intervention d'un facteur protéique supplémentaire, appelé **rho**, est nécessaire pour déceler les signaux de terminaison. Les ARN à signaux de terminaison rho-dépendante ne présentent pas de séquence de résidus U à l'extrémité de l'ARN et sont habituellement dépourvus de boucle en épingle à cheveux. Un modèle de terminaison rho-dépendante est montré dans la figure 13-13. Le facteur rho est un hexamère constitué de six sous-unités identiques qui se sert de l'hydrolyse de l'ATP en ADP et Pi pour réaliser la réaction de terminaison. La première étape de la terminaison est la liaison de rho à un site spécifique de l'ARN appelé *rut* (figures 13-13a et b). Une fois lié à l'ARN, rho détache celui-ci de l'ARN polymérase, probablement en se déplaçant le long de cet ARN, ainsi que le montrent les figures 13-13b et c. Les sites *rut* sont localisés juste en amont (c'est-à-dire en 5') de séquences où l'ARN polymérase effectue une pause.

L'efficacité des deux mécanismes de terminaison est également influencée par les séquences environnantes et par d'autres facteurs protéiques.

La traduction

Bien que l'ARNm dirige la synthèse des protéines, si vous mélangez de l'ARNm avec les 20 acides aminés dans un tube à essai et espérez obtenir des protéines, vous serez déçu. D'autres composants sont nécessaires ; la découverte de leur nature fut la clé de la compréhension du mécanisme de la traduction. C'est une technique de centrifugation simple et élégante qui permit d'identifier ces composants supplémentaires.

L'utilisation des gradients de saccharose

Le **gradient de densité en saccharose** est préparé en déposant successivement les unes au dessus des autres dans un tube à centrifuger des couches de solutions de saccharose de moins en moins concentrées. L'échantillon à examiner est déposé délicatement à la surface du gradient. En centrifugeant la solution à très grande vitesse dans un appareil qui permet aux tubes d'osciller librement, les matériaux en cours de sédimentation migrent dans le gradient à des vitesses différentes qui dépendent de la taille et de la forme des molécules. Les grandes molécules migrent plus loin en un temps donné que les petites. Les molécules séparées de cette manière peuvent ensuite être recueillies individuellement en récoltant les

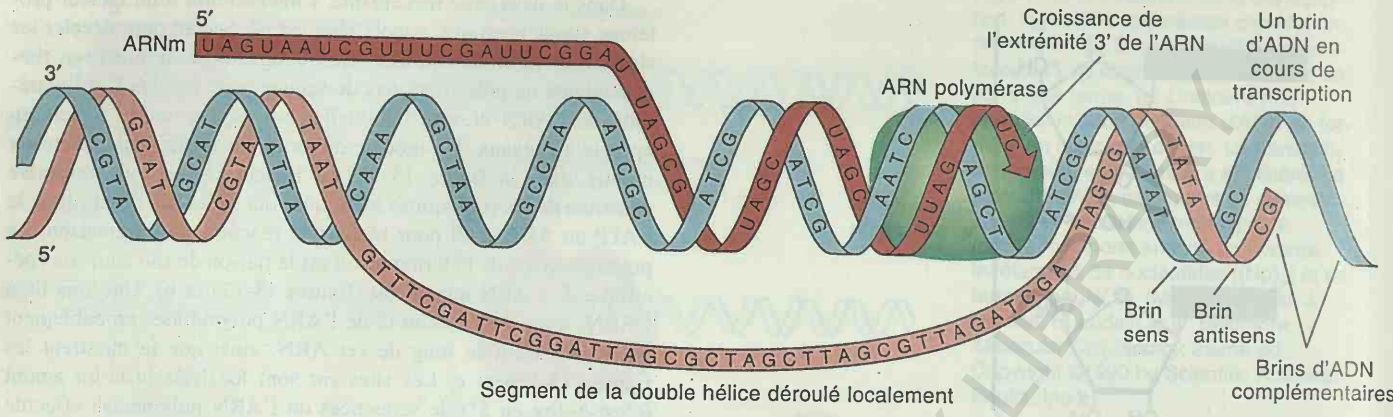


Figure 13-11. La transcription par l'ARN polymérase. Un brin d'ARN est synthétisé dans la direction 5′→3′ à partir d'une région localement monocaténaire de l'ADN. (D'après E. J. Gardner, M. J. Simmons et D. P. Snustad, *Principles of Genetics*, 8ième éd. Copyright ©1991 by John Wiley and Sons, Inc.)

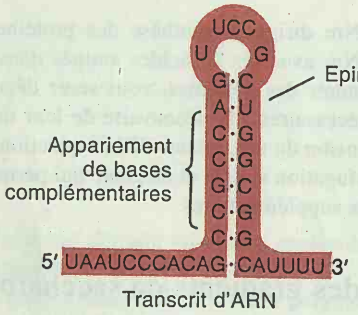


Figure 13-12. La structure d'un site de terminaison pour l'ARN polymérase chez les bactéries. La structure en épingle à cheveux se forme par l'appariement de bases complémentaires *dans* le brin d'ARN.

unes après les autres les gouttes qui s'échappent par une petite ouverture ménagée à la base du tube (figure 13-14). La vitesse avec laquelle une fraction migre vers le fond du tube dépend de son coefficient de sédimentation (S) qui est lui-même une mesure de la taille des molécules de cette fraction.

Il est important de noter la différence entre un gradient de saccharose et le gradient de CsCl que nous avons envisagé au chapitre 11. Dans un gradient de CsCl, les molécules étudiées ont une densité comprise entre celles des solutions de CsCl les plus et les moins concentrées formées dans le gradient. A l'équilibre elles vont donc se placer à un point spécifique de ce gradient. Dans un gradient de saccharose, les molécules étudiées sont plus denses que toutes les concentrations de saccharose utilisées de sorte qu'à l'équilibre elles formeraient un culot au fond du tube. Mais elles migrent vers le fond avec des vitesses différentes selon leur taille et leur forme. En comparant à un temps donné les positions de

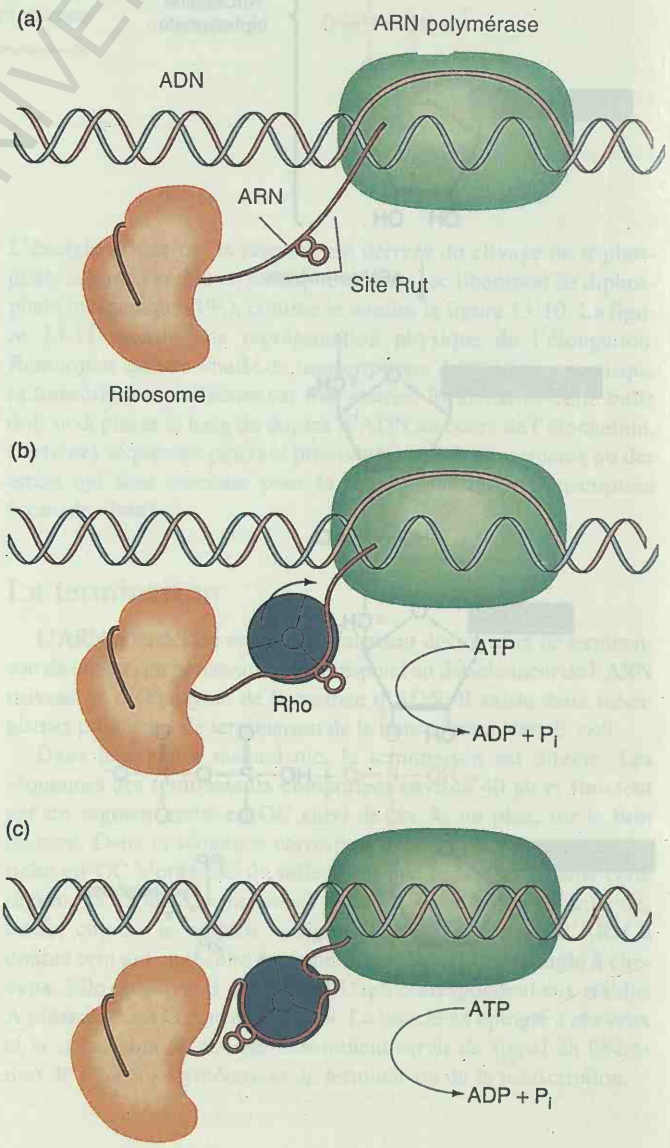


Figure 13-13. Un modèle pour l'action de rho sur un ARN cotraduit naissant. (Adapté d'après J. P. Richardson, *Cell* 64, 1991, 1047-1049.)

EUROPEAN UNIVERSITY LIBRARY

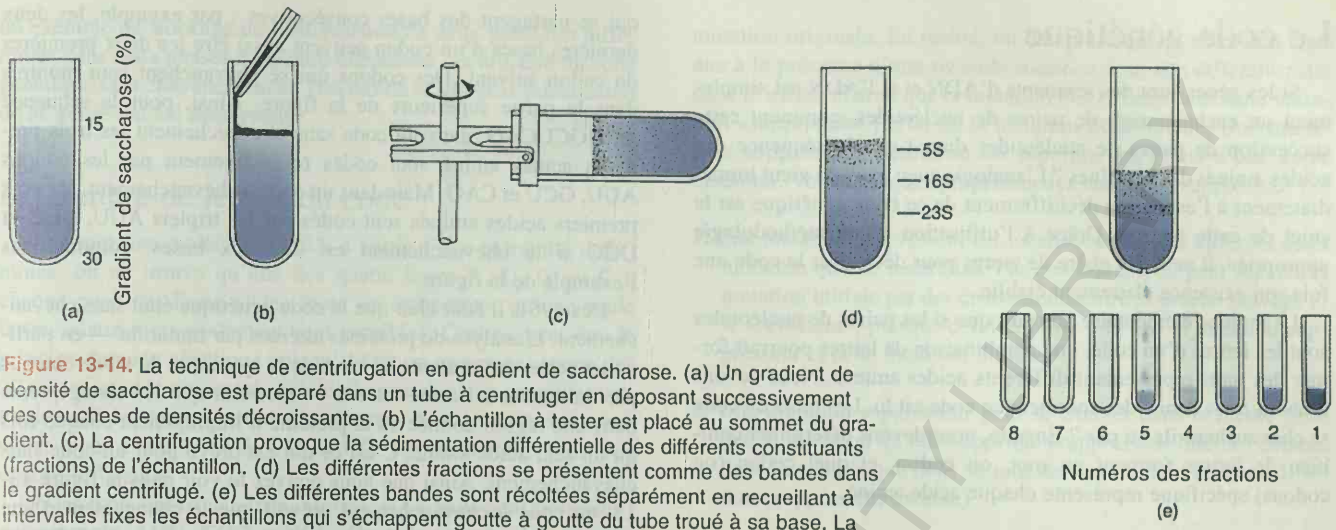


Figure 13-14. La technique de centrifugation en gradient de saccharose. (a) Un gradient de densité de saccharose est préparé dans un tube à centrifuger en déposant successivement des couches de densités décroissantes. (b) L'échantillon à tester est placé au sommet du gradient. (c) La centrifugation provoque la sédimentation différentielle des différents constituants (fractions) de l'échantillon. (d) Les différentes fractions se présentent comme des bandes dans le gradient centrifugé. (e) Les différentes bandes sont récoltées séparément en recueillant à intervalles fixes les échantillons qui s'échappent goutte à goutte du tube troué à sa base. La valeur S d'une fraction est basée sur sa position dans le gradient, qui est elle-même déterminée par le moment où elle s'échappe de la base du tube. (Extrait de A. Rich «Polyribosomes.» Copyright ©1963 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés)

chaque molécule dans le gradient, on peut déterminer les tailles relatives de ces molécules.

Les différentes classes de molécules d'ARN

En utilisant le pouvoir séparateur de la technique de centrifugation en gradient de saccharose, il est possible d'identifier diverses molécules et agrégats de molécules présents dans un système de synthèse des protéines. Les principaux constituants en sont les ARN de transfert (ARNt), les ribosomes et l'ARN messager (ARNm). Les ARN de transfert constituent une classe de petites molécules d'ARN (4S) de structures et de fonctions similaires. Les séquences nucléotidiques complètes d'un grand nombre d'ARNt d'organismes différents ont été déterminées.

Les ribosomes, qui sont les sites de la synthèse des protéines, sont des organites cellulaires résultant d'un assemblage complexe de diverses protéines ribosomiques avec des ARN ribosomiques (ARNr). Chez *E. coli*, par exemple, au moins trois molécules d'ARN ribosomique différentes peuvent être distinguées sur la base de la taille : 23S, 16S et 5S. Nous ne savons pas exactement comment l'ARNr se lie aux composants protéiques des ribosomes, ni quelles sont les fonctions de chacun de ceux-ci. Sous le microscope électronique, le ribosome apparaît comme globulaire. Par un traitement chimique, il peut être scindé en deux sous-unités globulaires principales (50S et 30S chez *E. coli*). Plus loin, nous considérerons en détail les structures des ARNt et des ARNr.

Les molécules d'ARNr aussi bien que celles d'ARNt peuvent former des d'hybrides ARN-ADN in vitro, ce qui indique que toutes deux sont transcrites à partir d'une matrice d'ADN. Le tableau 13-2 présente les principaux types d'ARN que l'on peut trouver dans un système de synthèse des protéines.

D'autres composants sont nécessaires pour réaliser la synthèse des protéines in vitro. Il s'agit de plusieurs enzymes, de divers «facteurs» protéiques et d'une source d'énergie chimique. Le donneur d'énergie est nécessaire parce qu'une structure organisée est créée à partir d'un mélange de substances—un processus qui exige de l'énergie parce que le système doit perdre de l'entropie (la mesure du désordre ou du chaos). Nous envisagerons le mécanisme de la synthèse des protéines après avoir considéré le code génétique.

Tableau 13-2. Les molécules d'ARN d'*E. coli.*

Type	Pourcentage de l'ARN cellulaire	Coefficient de sédimentation (S)	Poids moléculaire	Nombre de nucléotides
ARN ribosomique (ARNr)	80	23	$1{,}2 \times 10^6$	3700
		16	$0{,}55 \times 10^6$	1700
		5	$3{,}6 \times 10^4$	1700
ARN de transfert (ARNt)	15	4	$2{,}5 \times 10^4$	75
ARN messager (ARNm)	5		Hétérogène	Variable

SOURCE : Adapté de L. Stryer, *Biochemistry,* 4ième éd. Copyright ©1995 by W. H. Freeman and Company.

Le code génétique

Si les gènes sont des segments d'ADN et si l'ADN est simplement un enchaînement de paires de nucléotides, comment cette succession de paires de nucléotides dicte-t-elle la séquence des acides aminés des protéines ? L'analogie avec un code vient immédiatement à l'esprit. Le déchiffrement de ce code génétique est le sujet de cette section. Grâce à l'utilisation d'une méthodologie appropriée, il ne fallut guère de temps pour déchiffrer le code une fois son existence clairement établie.

La logique élémentaire nous dit que si les paires de nucléotides sont les lettres d'un code, une combinaison de lettres pourrait former des mots représentant différents acides aminés. Nous devons d'abord nous demander comment ce code est lu. Les mots du code se chevauchent-ils ou pas ? Ensuite, nous devons déterminer combien de lettres forment un mot, ou **codon**, et quel codon (ou codons) spécifique représente chaque acide aminé.

Codes avec ou sans chevauchement

La figure 13-15 montre les différences qui existent entre des codes avec ou sans chevauchement. L'exemple présenté est celui d'un code à trois lettres ou **code à triplets**. Dans un code sans chevauchement, les acides aminés consécutifs sont spécifiés par des mots codes (codons) qui se suivent et ne se recouvrent pas comme le montre la partie inférieure de la figure. Dans un code à chevauchement, les acides aminés consécutifs sont codés par des triplets qui se partagent des bases consécutives ; par exemple, les deux dernières bases d'un codon peuvent aussi être les deux premières du codon suivant. Des codons qui se chevauchent sont montrés dans la partie supérieure de la figure. Ainsi, pour la séquence AUUGCUCAG, dans un code sans chevauchement les trois premiers acides aminé sont codés respectivement par les codons AUU, GCU et CAG. Mais dans un code à chevauchement, les trois premiers acides aminés sont codés par les triplets AUU, UUG et UGC si le chevauchement est de deux bases, comme dans l'exemple de la figure.

Dès 1961, il était clair que le code génétique était sans chevauchement. L'analyse de protéines altérées par mutation — en particulier celles des mutants du virus de la mosaïque du tabac obtenus par traitement à l'acide nitreux — montrait que les changements dans une région donnée de la protéine n'impliquaient chaque fois qu'un seul acide aminé. C'est ce qui est prévu pour un code sans chevauchement. Ainsi que vous pouvez le voir dans la figure 13-15, un code à chevauchement prévoit que le changement d'une seule base modifie jusqu'à trois acides aminés adjacents de la protéine.

Il faut noter que si l'intervention d'un *code* à chevauchement était écartée par l'analyse des protéines de mutants, rien n'excluait cependant l'utilisation de phases de lecture alternées pour coder les séquences d'acides aminés de deux protéines différentes. Dans l'exemple présent, une protéine pouvait être codée par la série de codons AUU, GCU, CAG, CUU, etc, tandis qu'une deuxième protéine pouvait être codée par des codons décalés d'une base se lisant dès lors UUG, CUC, AGC, UUG, et ainsi de suite. C'est là

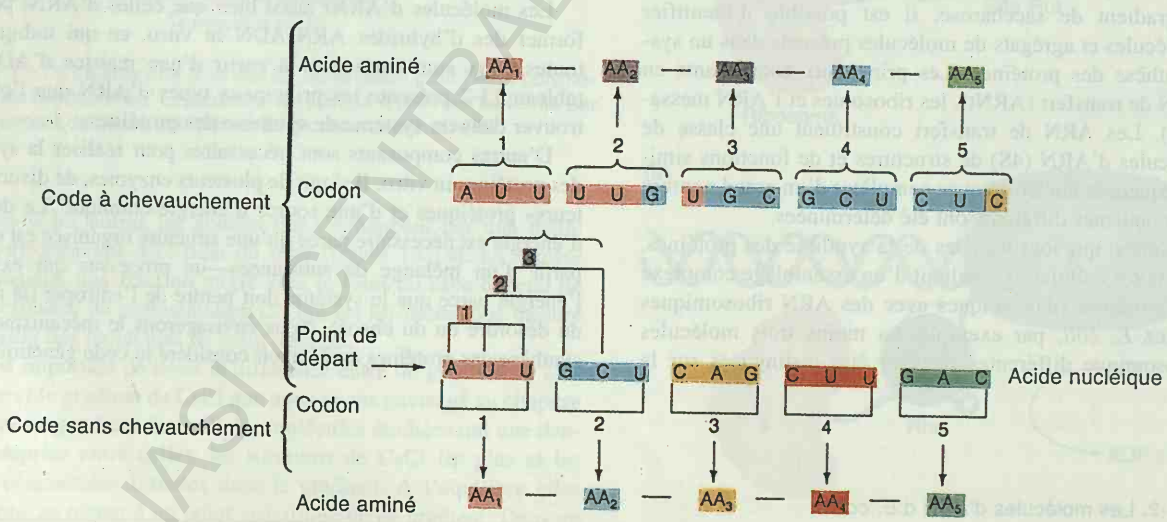


Figure 13-15. La différence entre un code à chevauchement et un code sans chevauchement. Le cas illustré est celui d'un code à trois lettres (code à triplets). Un code à chevauchement utilise des codons qui comportent certains nucléotides impliqués dans d'autres codons correspondant à la même protéine, ainsi que le montre la partie supérieure du schéma (pour la séquence d'ADN illustrée dans la partie inférieure). Dans un code sans chevauchement, une protéine est traduite en lisant des codons qui ne comportent jamais de nucléotides communs. Notez que la désignation d'un acide aminé par «AA_2», «AA_3», etc. dans le modèle sans chevauchement ne signifie pas qu'il est identique à celui qui porte le même numéro dans le modèle à chevauchement. Ceci parce que les triplets qui correspondent aux codons des deux AA_3, par exemple, sont différents et coderaient fort probablement pour des acides aminés différents. Des numéros identiques pour des acides aminés dans les deux modèles signifient qu'ils occupent la même position dans la chaîne protéique.

un exemple de stockage de l'information de deux protéines différentes dans deux phases de lecture différentes, en utilisant un code génétique sans chevauchement. Des cas de stockage d'information de ce genre ont été découverts.

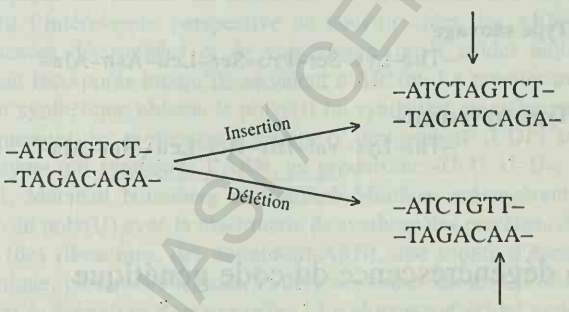
Le nombre de lettres du code

En lisant une molécule d'ARN à partir d'une extrémité déterminée, on ne trouve qu'une des quatre bases A, U, G ou C à chaque position. Donc si les mots ne comportent qu'une seule lettre, quatre mots seulement sont possibles. Ceci ne peut être le principe du code génétique puisqu'il faut un mot pour chacun des 20 acides aminés rencontrés habituellement dans les protéines cellulaires. Si les mots sont de deux lettres, $4^2 = 16$ mots sont possibles ; par exemple, AU, CU ou CC. Ce vocabulaire n'est pas encore suffisant.

Si les mots ont trois lettres, alors $4^3 = 64$ mots sont possibles ; par exemple, AUU, GCG ouUGC. Ce code fournit plus de mots qu'il n'en faut pour décrire les vingt acides aminés. Nous pouvons en conclure que le code génétique comprend au moins trois paires de nucléotides. Toutefois si tous les mots sont des «triplets», nous avons un excès considérable de mots par rapport aux 20 qui sont nécessaires pour représenter les acides aminés habituels.

L'utilisation des suppresseurs pour montrer qu'il s'agit d'un code à triplets

La preuve décisive qu'un codon comporte trois lettres (et pas davantage) fut fournie par d'élégantes expériences génétiques entamées en 1961 par Francis Crick, Sidney Brenner et leurs collaborateurs qui utilisèrent des mutants du locus *rII* du phage T4. Des mutations entraînant le phénotype *rII* (voir le chapitre 12) furent induites au moyen d'un agent chimique appelé proflavine qui passait pour provoquer des insertions ou des délétions d'une seule paire de nucléotides dans l'ADN (Cette conclusion est fondée sur des preuves expérimentales qui ne sont pas rapportées ici). L'exemple suivant illustre le mode d'action de la proflavine sur l'ADN bicaténaire.



Partant d'une mutation induite par la proflavine et appelée FCO, Crick et ses collègues utilisèrent à nouveau la proflavine pour induire des «réversions» (des mutations inverses) qui furent mises en évidence par la formation de plages de lyse de type sauvage sur la souche d'*E. coli* K(λ). L'analyse génétique des mutants responsables de ces plages montra que ces «révertants» n'étaient pas identiques aux vrais phages de type sauvage, ce qui suggérait que la mutation réverse n'était pas exactement l'inverse de la mutation originale. En réalité, on démontra que la réversion était due à la présence d'une *seconde mutation* à un site différent mais dans le même cistron que la mutation FCO ; cette deuxième mutation «supprimait» l'effet de la mutation FCO initiale. Une **mutation suppresseur** neutralise ou supprime les effets d'une autre mutation. Voici quelques propriétés des mutations suppresseur :

1. Une mutation suppresseur est localisée en un site différent de la mutation qu'elle neutralise. Par conséquent, on peut séparer la mutation initiale par des croisements entre la souche sauvage et le «révertant», puisque celui-ci porte à la fois la mutation suppresseur et cette mutation initiale.

2. Une mutation suppresseur peut se trouver dans le même gène que la mutation qu'elle supprime (suppresseur interne) comme dans l'exemple que nous venons de voir ou dans un gène différent (suppresseur externe).

3. Différents suppresseurs peuvent exercer leurs effets de manières différentes. Par exemple, certains suppresseurs agissent au niveau de la transcription ou de la traduction ; d'autres modifient la physiologie de la cellule.

La mutation suppresseur put être séparée de la mutation originale par recombinaison, et lorsque cela fut fait, on constata que la mutation suppresseur était elle-même une mutation *rII* (figure 13-16).

Comment dès lors expliquer ces résultats ? Si nous supposons que la lecture est polarisée—c'est-à-dire si le cistron ne peut être lu qu'à partir d'une de ses extrémités— l'addition ou la délétion initiale entraînerait un phénotype mutant parce qu'elle interrompait le mécanisme de lecture qui indique normalement quels groupes de lettres doivent être lus comme des mots. Par exemple, si chaque triplet de paires de nucléotides formait un mot, la «phase de lecture» pourrait être établie en prenant les trois premières paires à partir d'une extrémité comme premier mot, les trois paires suivantes comme le deuxième mot, et ainsi de suite. Dans ce cas, une addition ou une délétion d'une seule paire de bases provoquée par la proflavine décalerait la phase de lecture à partir de ce point

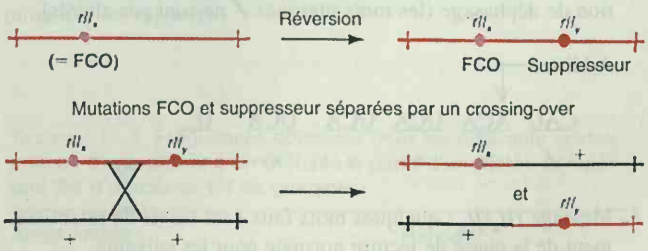


Figure 13-16. Le suppresseur d'une mutation *rII* initiale est lui-même identifié comme une mutation *rII* après la séparation de ces mutations par un crossing-over. Le mutant initial, FCO, avait été induit par la proflavine. Par la suite, lorsque la souche FCO fut traitée une nouvelle fois à la proflavine, un révertant qui à première vue semblait être une souche sauvage fut obtenu. Toutefois, on constata qu'une seconde mutation avait été induite dans la région *rII* et que le double mutant $rII_x\,rII_y$ n'était pas tout à fait identique à la souche sauvage de départ.

et provoquerait la lecture erronée de tous les mots suivants. Une **mutation de déphasage** (frame-shift) de ce genre réduirait la majeure partie du message génétique à du charabia. Toutefois, la phase de lecture normale pourrait être rétablie par une insertion ou une délétion compensatrice située à un endroit différent et ne laissant subsister qu'une courte section de charabia. Voyons l'exemple suivant où des mots français de trois lettres sont utilisés pour représenter les codons :

ILS ONT MIS UNE DES SIX VIS

Enlevons M : ILS ONT ISU NED ESS IXV IS

Insérons A : ILS ONT ISA UNE DES SIX VIS

L'insertion supprime l'effet de la délétion en restaurant le sens de la majeure partie de la phrase. Pourtant, l'insertion à elle seule bouleverse la phrase :

ILS ONT MIS AUN EDE SSI XVI S

Si nous supposons que la mutation FCO est provoquée par l'addition d'une base, la deuxième mutation (suppresseur) doit être une délétion puisque, comme nous l'avons vu, elle rétablit la phase de lecture du gène (une seconde insertion ne corrigerait pas la phase de lecture). Dans les diagrammes suivants, nous utilisons pour la simplicité une chaîne nucléotidique imaginaire pour représenter l'ARN, en sachant que la chaîne complémentaire est dictée automatiquement par la spécificité de l'appariement des bases. Nous supposons aussi que les mots du code comportent trois lettres et sont lus dans une seule direction (de gauche à droite dans nos schémas).

1. Message de type sauvage

CAU CAU CAU CAU CAU

2. Message rII_a : les mots distaux sont modifiés (x) par une mutation de déphasage (les mots marqués ✓ ne sont pas altérés)

Addition

CAU ACA UCA UCA UCA U_

✓ x x x x

3. Message $rII_a rII_b$: quelques mots faux sont suivis du rétablissement de la phase de lecture normale pour les suivants

Délétion

CAU ACA UCU CAU CAU

✓ x x ✓ ✓

Les quelques mots faux dans le génotype supprimé expliquent que les «révertants» (de phénotype supprimé) obtenus par Crick et ses collaborateurs n'aient pas présenté exactement le même phénotype que les vraies souches sauvages.

Nous avons supposé ici que la mutation de déphasage initiale correspondait à une addition, mais cette explication s'applique aussi bien au cas où la mutation FCO initiale est une délétion et la mutation suppresseur une addition. Si la mutation FCO est définie comme «plus», les mutations suppresseur sont automatiquement «moins». Les expériences ont confirmé qu'un plus ne peut pas supprimer un plus et qu'un moins ne peut pas corriger un moins. En d'autres mots, deux mutations de même signe ne peuvent jamais agir comme des suppresseurs l'une de l'autre. Par contre, il est intéressant de constater que des combinaisons de *trois* plus ou de *trois* moins peuvent agir de concert pour rétablir le phénotype sauvage.

Cette observation constitua la première démonstration expérimentale de ce qu'un mot du code génétique comprend trois paires de nucléotides, c'est-à-dire un triplet. Ceci provient de ce que trois additions ou trois délétions dans un gène rétablissent automatiquement la phase de lecture si les mots sont des triplets. Par exemple,

Délétions

CAU CAU CAU CAU CAU CAU CAU

CAU ACA UAU CAU CAU CAU

✓ x x ✓ ✓ ✓

La preuve que les conclusions tirées de l'étude des effets de la proflavine étaient correctes fut fournie par l'analyse des mutations induites par cet agent dans un gène dont le produit protéique pouvait être analysé. George Streisinger utilisa le gène qui code pour le lysozyme dont la séquence des acides aminés était connue. Il induisit une mutation dans ce gène au moyen de la proflavine et sélectionna ensuite des «révertants», également induits par la proflavine. Ceux-ci furent identifiés comme des doubles mutants portant des mutations de signes opposés. En analysant la protéine synthétisée par le double mutant, il constata la présence d'une séquence d'acides aminés incorrecte entre deux extrémités de type sauvage, exactement comme on le prévoyait :

Type sauvage

–Thr–Lys–Ser–Pro–Ser–Leu–Asn–Ala–

Type «révertant»

–Thr–Lys–Val–His–His–Leu–Met–Ala–

La dégénérescence du code génétique

Les travaux de Crick ont en outre établi que le code génétique est **dégénéré**. Cette expression ne traduit pas un sentiment de réprobation ! Il indique simplement que chacun des 64 triplets doit avoir une signification dans le code, de telle sorte que certains des acides aminés au moins doivent être spécifiés par deux ou trois triplets. Si 20 triplets seulement étaient utilisés (les 44 autres étant des codons non-sens ne codant pour aucun acide aminé), la plupart des mutations de déphasage créeraient des mots dépourvus de sens qui arrêteraient probablement le processus de synthèse des protéines. Si c'était le cas, la suppresion des mutations non-sens se

produirait rarement. Par contre, si tous les triplets spécifiaient un acide aminé, les codons modifiés provoqueraient simplement l'insertion d'un acide aminé incorrect (un mot de charabia) dans la protéine. C'est pourquoi Crick fit le raisonnement que beaucoup sinon tous les acides aminés devaient avoir plusieurs noms différents dans le code ; cette hypothèse fut confirmée par la suite sur le plan biochimique.

Bilan

Résumons les points acquis à ce stade en ce qui concerne le code génétique :

1. Le code ne comporte pas de chevauchements.

2. Trois bases codent pour un acide aminé. Ces triplets sont appelés des *codons*.

3. La lecture du code débute à un point fixe et se poursuit jusqu'à la fin de la séquence codante. Nous savons ceci parce qu'une seule mutation de déphasage dans la séquence codante suffit à modifier tous les codons qui suivent dans cette séquence.

4. Le code est dégénéré, en ce sens que certains acides aminés sont spécifiés par plus d'un codon.

Le déchiffrement du code

Le déchiffrement du code génétique, c'est-à-dire la détermination de l'acide aminé spécifié par chaque triplet, constitue un des plus remarquables progrès de la génétique au cours des trente dernières années. Une fois les techniques expérimentales disponibles, le code fut déchiffré extrêmement rapidement.

La première étape fut la découverte de la manière de produire des ARNm synthétiques. Si les nucléotides qui constituent l'ARN sont mis en présence d'une enzyme particulière (la polynucléotide phosphorylase), un ARN à un seul brin est formé. Aucun ADN n'est nécessaire pour cette synthèse et les nucléotides sont donc incorporés au hasard. La possibilité de synthétiser des ARNm ouvrit l'intéressante perspective de pouvoir créer des ARN de séquences déterminées et de voir ensuite quels acides aminés étaient incorporés lorsqu'ils servaient d'ARNm. Le premier messager synthétique obtenu, le poly(U) fut synthétisé en mélangeant uniquement des molécules d'uridine-5'-diphosphate (UDP) avec l'enzyme qui synthétise l'ARN, en produisant –U–U–U–U–. En 1961, Marshall Nirenberg et Heinrich Matthaei mélangèrent in vitro du poly(U) avec la machinerie de synthèse des protéines d'*E. coli* (des ribosomes, des aminoacyl-ARNt, une source d'énergie chimique, plusieurs enzymes, et diverses autres choses) et *observèrent la formation d'une protéine* ! La séquence d'acides aminés de cette protéine était évidemment attendue avec curiosité. Elle s'avéra être la polyphénylalanine — une chaîne de molécules de phénylalanine liées entre elles par des liaisons peptidiques. Ainsi, le triplet UUU devait coder pour la phénylalanine :

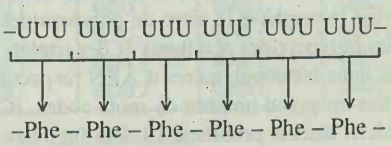


Tableau 13-3. Fréquences attendues pour les différents codons d'un ARNm synthétique composé de 3/4 d'uracile et d'1/4 de guanine

Codon	Probabilité	Rapport*
UUU	$p(UUU) = 3/4 \times 3/4 \times 3/4 = 27/64$	1,00
UUG	$p(UUG) = 3/4 \times 3/4 \times 1/4 = 9/64$	0,33
UGU	$p(UGU) = 3/4 \times 1/4 \times 3/4 = 9/64$	0,33
GUU	$p(GUU) = 1/4 \times 3/4 \times 3/4 = 9/64$	0,33
UGG	$p(UGG) = 3/4 \times 1/4 \times 1/4 = 3/64$	0,11
GGU	$p(GGU) = 1/4 \times 1/4 \times 3/4 = 3/64$	0,11
GUG	$p(GUG) = 1/4 \times 3/4 \times 1/4 = 3/64$	0,11
GGG	$p(GGG) = 1/4 \times 1/4 \times 1/4 = 1/64$	0,03

*La fréquence de UUU est la fréquence de base par rapport à laquelle les fréquences des autres codons sont mesurées pour établir les rapports respectifs. Le rapport pour UUG, par exemple, est dérivé du rapport p(UUG)/p(UUU) =0,33.

Ce mode d'analyse fut développé en mélangeant des proportions connues de nucléotides différents au cours de la synthèse des ARNm. Dans une première expérience, les nucléotides UDP et GDP furent utilisés dans le rapport de 3 à 1. Lorsque ces nucléotides sont incorporés au hasard dans l'ARNm synthétique, les fréquences relatives avec lesquelles chaque triplet apparaît dans la séquence peuvent être calculées (tableau 13-3). Dans ce tableau, notez que UUU sert de fréquence de base par rapport à laquelle les autres fréquences sont mesurées en calculant leurs rapports respectifs. UUG, par exemple, avec une probabilité p(UUG)=9/64, serait attendu trois fois moins souvent que UUU, avec une probabilité p(UUU)=27/64. Autrement dit, p(UUG)/pUUU=9/27=1/3= 0,33, ce qui est le rapport fourni pour UUG dans le tableau 13-3.

Si ces codons spécifiaient des acides aminés différents (et n'étaient pas redondants), nous nous attendrions à ce que les acides aminés synthétisés par ce mélange particulier de guanine et d'uracile reflètent les rapports des différents codons. Bien qu'une certaine redondance existe parmi ces codons, les rapports d'acides aminés obtenus dans ce mélange de bases (voir le tableau 13-4) sont effectivement très semblables à ceux montrés dans le tableau 13-3 pour les rapports de fréquences des codons. (Dans le tableau 13-4, la phénylalanine est utilisée comme référence pour la détermination des rapports.)

Tableau 13-4. Fréquences obtenues pour les différents acides aminés d'une protéine synthétisée à partir d'un ARNm comportant 3/4 d'uracile et 1/4 de guanine

Acide aminé	Rapport*
Phénylalanine	1,00
Leucine	0,37
Valine	0,36
Cystéine	0,35
Tryptophane	0,14
Glycine	0,12

*La concentration de phénylalanine est utilisée comme la concentration de base par rapport à laquelle les concentrations des autres acides aminés sont mesurées pour calculer leurs rapports respectifs. Remarquez la corrélation avec les rapports du tableau 13-3.

De ces données, nous pouvons déduire que les codons qui comportent une guanine et deux uraciles (G+2U) codent pour la valine, la leucine et la cystéine, sans pouvoir distinguer quelle séquence spécifique correspond à chacun de ces acides aminés. De même un uracile et deux guanines (U + 2G) doivent coder pour le tryptophane, la glycine et peut-être un troisième acide aminé. Le modèle de Watson et Crick apparaît donc comme valide en ce qu'il prévoit l'importance de la séquence précise des bases (et pas seulement leurs proportions). Diverses correspondances provisoires (comme celles que nous venons de citer pour les G et les U) furent bientôt obtenues, surtout par les groupes qui travaillaient avec Nirenberg ou avec Severo Ochoa.

Avant de considérer la signification d'autres codons, nous examinerons les molécules d'ARNt dans le but d'expliquer le lien qui existe entre les codons de l'ARNm et la reconnaissance des acides aminés.

La reconnaissance des codons par les ARNt

Est-ce l'ARNt ou l'acide aminé lui-même qui reconnaît la portion de l'ARNm, appelée codon, qui code pour un acide aminé particulier ? Une expérience très concluante a répondu à cette question. Dans cette expérience, le cystéinyl-ARNt ($ARNt^{Cys}$, l'ARNt spécifique de la cystéine) chargé de cystéine fut traité par l'hydrure de nickel qui convertit la cystéine (toujours liée à l'$ARNt^{Cys}$) en un autre acide aminé, l'alanine, sans modifier l'ARNt :

$$\text{Cystéine—}ARNt^{Cys} \xrightarrow[\text{de nickel}]{\text{hydrure}} \text{alanine—}ARNt^{Cys}$$

La protéine synthétisée en présence de cette espèce hybride possédait de l'alanine partout où on attendait de la cystéine. Cette expérience montre donc que les acides aminés sont «illettrés» ; ils sont insérés à la position correcte parce que les ARNt «adaptateurs» reconnaissent les codons de l'ARNm et introduisent l'acide aminé adéquat. On pouvait donc s'attendre à trouver sur la molécule d'ARNt un site capable de reconnaître le codon de l'ARNm par l'appariement de bases complémentaires.

La figure 13-17a montre plusieurs des sites fonctionnels de la molécule d'ARNt. Le site qui reconnaît un codon de l'ARNm est appelé **anticodon** ; ses bases sont complémentaires et antiparallèles par rapport à celles du codon. Un autre site reconnaissable opérationnellement est le site d'attachement de l'acide aminé. Les autres bras interviennent probablement dans la liaison de l'ARNt au ribosome. La figure 13-17b représente un ARNt spécifique (l'ARNt de l'alanine chez la levure). Les feuilles de trèfle «aplaties» montrées dans ce schéma ne correspondent pas à la conformation normale des molécules d'ARNt ; l'ARNt se présente habituellement comme une feuille de trèfle repliée pour former un L, comme le montre la figure 13-17c. Ces diagrammes sont basés sur des analyses chimiques très sophistiquées de la séquence nucléotidique de l'ARNt et sur des données cristallographiques qui concernent la forme de l'ensemble de la molécule. Tout en présentant de nombreuses similitudes structurales, les diverses molécules d'ARNt possèdent chacune une forme tridimensionnelle différente qui leur permet d'être reconnues par la synthétase correcte. Cette spécificité de charge des ARNt est cruciale pour l'exactitude de la synthèse des protéines.

D'où provient l'ARNt ? Lorsqu'on introduit de l'ARNt radioactif dans le noyau d'une cellule dont l'ADN a été partiellement dénaturé par chauffage, la radioactivité (détectée par autoradiographie) apparaît à des endroits précis des chromosomes. Ces régions correspondent vraisemblablement à la localisation des gènes des ARNt ; ce sont des régions de l'ADN qui sont transcrites en ARNt plutôt qu'en ARNm responsables de la production de protéines. L'ARNt marqué s'hybride à ces sites en raison de la complémentarité des séquences de bases de l'ARNt et du gène correspondant. Une situation similaire existe pour l'ARNr. Nous voyons donc que l'hypothèse un gène — une enzyme n'est pas toujours valable. Certains gènes ne codent pas pour des protéines ; au contraire, ils spécifient les ARN de l'appareil de traduction.

Message Certains gènes codent pour des protéines ; d'autres spécifient des ARN (ARNt et ARNr) en tant que produits finals.

Comment l'ARNt acquiert-il sa forme si particulière ? Il se replie probablement spontanément pour prendre une conformation qui offre la stabilité maximale. L'ARN de transfert contient de nombreuses bases *inhabituelles* ou modifiées (comme le pseudouracile, ψ) parmi ses nucléotides ; ces bases jouent un rôle spécifique dans le repliement et sont également impliquées dans d'autres fonctions de l'ARNt. Vous avez peut-être remarqué des appariements inhabituels dans les boucles des ARNt de la figure 13-17b ; un G est apparié à un U (au lieu d'un C). Cet appariement à première vue erroné sera discuté dans la section suivante.

De nouveaux mots codes

Les mots codes précis furent déchiffrés grâce à deux types d'expériences. La première comportait la préparation de «mini-ARNm» dont chacun ne comprenait que trois nucléotides. Ceux-ci sont évidemment trop courts pour promouvoir la traduction en protéines mais ils stimulent néanmoins la liaison des aminoacyl-ARNt (aa–ARNt) aux ribosomes dans une sorte de tentative de traduction avortée. Il est donc possible de synthétiser un mini-ARNm spécifique et de déterminer *quel* aminoacyl ARNt il va fixer aux ribosomes.

Par exemple, le problème des G + 2U discuté plus haut peut être résolu en utilisant les mini-ARNm suivants :

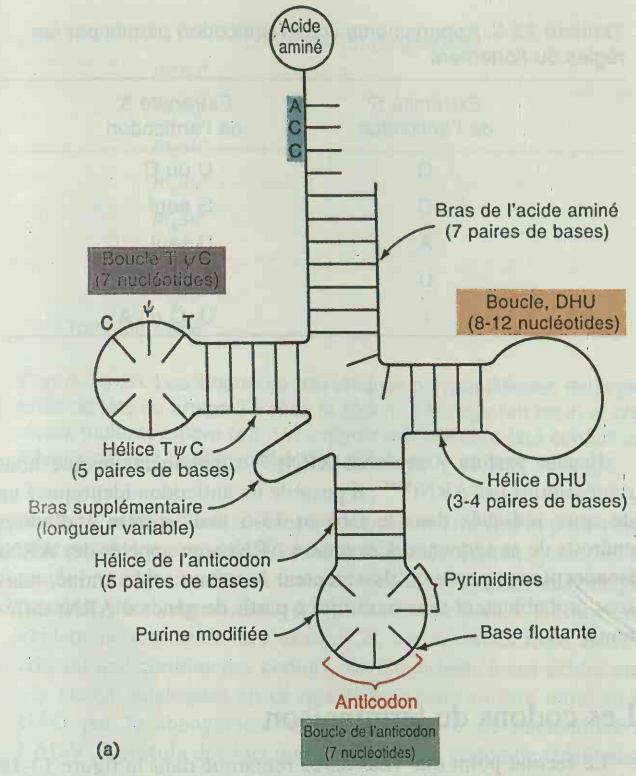
GUU — stimule la liaison du valyl-ARNt

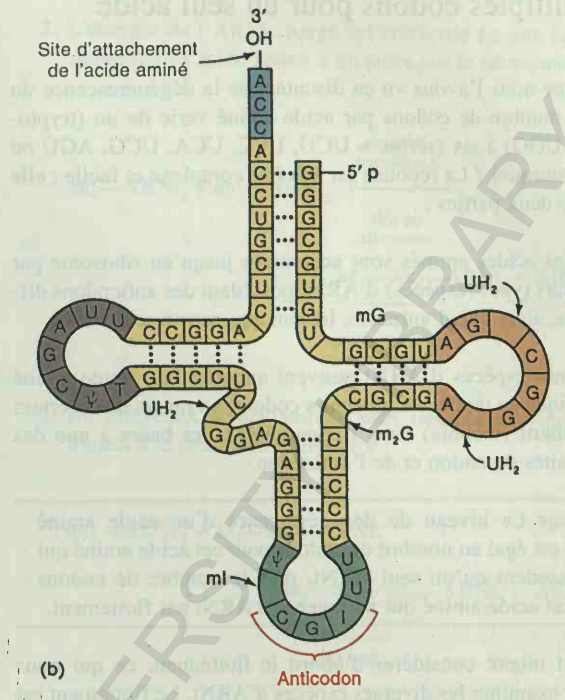
UUG — stimule la liaison du leucyl-ARNt

UGU — stimule la liaison du cystéinyl-ARNt

Des mini-ARN analogues permirent le déchiffrement presque complet des 64 (4^3) codons possibles.

Le deuxième type d'expériences qui fut utile pour déchiffrer le code génétique est celui des «copolymères répétitifs». Par exemple, le copolymère désigné $(AGA)_n$, qui correspond à une longue séquence de ...AGAAGAAGAAGAAGA..., fut utilisé pour promouvoir la synthèse in vitro de polypeptides. A partir de la séquence des polypeptides résultants et des triplets susceptibles d'être présents dans les copolymères d'ARN respectifs, il fut possible d'identifier un grand nombre de mots-codes. (Ce type d'expérience est décrit dans le problème 10, à la fin de ce chapitre. En





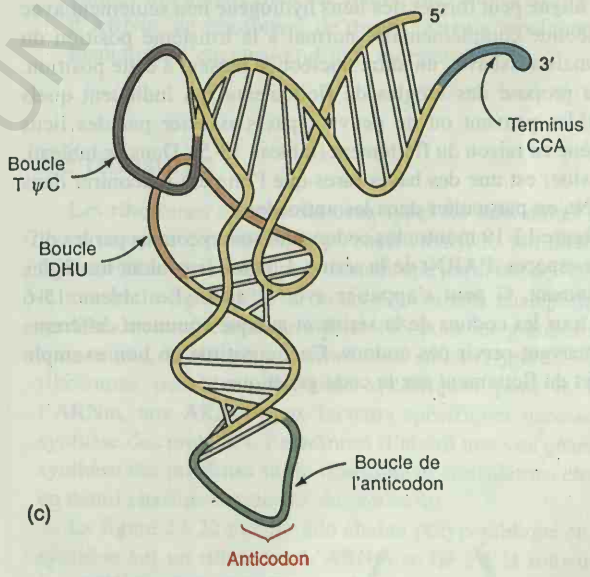


Figure 13-17. La structure de l'ARN de transfert. (a) Les régions fonctionnelles d'une molécule généralisée d'ARNt. (b) La séquence spécifique de l'ARNt de l'alanine chez la levure. Les flèches indiquent différents types de bases modifiées rares. (c) La structure tridimensionnelle de l'ARNt de la phénylalanine chez la levure. Les symboles ψ, mG, m_2G, ml et DHU (ou UH_2) sont des abréviations pour les bases modifiées pseudouridine, methylguanosine, dimethylguanosine, methylinosine et dihydrouridine, respectivement. (Partie (a) de S. Arnott «The structure of transfer RNA», *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 22, 1971, 186 ; parties (b) et (c) de L. Stryer, *Biochemistry*, 4ième éd. Copyright ©1995 par W. H. Freeman and Company ; la partie (c) est basée sur un dessin du Dr. Sung-Hou Kim.)

Deuxième lettre

Première lettre	U	C	A	G	Troisième lettre
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC Cys UGA Stop UGG Trp	U C A G
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	U C A G
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	U C A G
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	U C A G

Figure 13-18. Le code génétique.

le résolvant, vous vous mettrez à la place de H. Gobind Khorana qui reçut le Prix Nobel pour avoir réalisé ces expériences).

La figure 13-18 montre le dictionnaire des 64 mots du code génétique. Examinez soigneusement cette figure et méditez sur les miracles de la génétique moléculaire. Cet examen vous fera découvrir plusieurs points qui demandent encore à être expliqués.

MCGILL UNIVERSITY LIBRARY

De ces données, nous pouvons déduire que les codons qui comportent une guanine et deux uraciles (G+2U) codent pour la valine, la leucine et la cystéine, sans pouvoir distinguer quelle séquence spécifique correspond à chacun de ces acides aminés. De même un uracile et deux guanines (U + 2G) doivent coder pour le tryptophane, la glycine et peut-être un troisième acide aminé. Le modèle de Watson et Crick apparaît donc comme valide en ce qu'il prévoit l'importance de la séquence précise des bases (et pas seulement leurs proportions). Diverses correspondances provisoires (comme celles que nous venons de citer pour les G et les U) furent bientôt obtenues, surtout par les groupes qui travaillaient avec Nirenberg ou avec Severo Ochoa.

Avant de considérer la signification d'autres codons, nous examinerons les molécules d'ARNt dans le but d'expliquer le lien qui existe entre les codons de l'ARNm et la reconnaissance des acides aminés.

La reconnaissance des codons par les ARNt

Est-ce l'ARNt ou l'acide aminé lui-même qui reconnaît la portion de l'ARNm, appelée codon, qui code pour un acide aminé particulier ? Une expérience très concluante a répondu à cette question. Dans cette expérience, le cystéinyl-ARNt ($ARNt^{Cys}$, l'ARNt spécifique de la cystéine) chargé de cystéine fut traité par l'hydrure de nickel qui convertit la cystéine (toujours liée à l'$ARNt^{Cys}$) en un autre acide aminé, l'alanine, sans modifier l'ARNt :

$$\text{Cystéine—}ARNt^{Cys} \xrightarrow[\text{de nickel}]{\text{hydrure}} \text{alanine—}ARNt^{Cys}$$

La protéine synthétisée en présence de cette espèce hybride possédait de l'alanine partout où on attendait de la cystéine. Cette expérience montre donc que les acides aminés sont «illettrés» ; ils sont insérés à la position correcte parce que les ARNt «adaptateurs» reconnaissent les codons de l'ARNm et introduisent l'acide aminé adéquat. On pouvait donc s'attendre à trouver sur la molécule d'ARNt un site capable de reconnaître le codon de l'ARNm par l'appariement de bases complémentaires.

La figure 13-17a montre plusieurs des sites fonctionnels de la molécule d'ARNt. Le site qui reconnaît un codon de l'ARNm est appelé **anticodon** ; ses bases sont complémentaires et antiparallèles par rapport à celles du codon. Un autre site reconnaissable opérationnellement est le site d'attachement de l'acide aminé. Les autres bras interviennent probablement dans la liaison de l'ARNt au ribosome. La figure 13-17b représente un ARNt spécifique (l'ARNt de l'alanine chez la levure). Les feuilles de trèfle «aplaties» montrées dans ce schéma ne correspondent pas à la conformation normale des molécules d'ARNt ; l'ARNt se présente habituellement comme une feuille de trèfle repliée pour former un L, comme le montre la figure 13-17c. Ces diagrammes sont basés sur des analyses chimiques très sophistiquées de la séquence nucléotidique de l'ARNt et sur des données cristallographiques qui concernent la forme de l'ensemble de la molécule. Tout en présentant de nombreuses similitudes structurales, les diverses molécules d'ARNt possèdent chacune une forme tridimensionnelle différente qui leur permet d'être reconnues par la synthétase correcte. Cette spécificité de charge des ARNt est cruciale pour l'exactitude de la synthèse des protéines.

D'où provient l'ARNt ? Lorsqu'on introduit de l'ARNt radioactif dans le noyau d'une cellule dont l'ADN a été partiellement dénaturé par chauffage, la radioactivité (détectée par autoradiographie) apparaît à des endroits précis des chromosomes. Ces régions correspondent vraisemblablement à la localisation des gènes des ARNt ; ce sont des régions de l'ADN qui sont transcrites en ARNt plutôt qu'en ARNm responsables de la production de protéines. L'ARNt marqué s'hybride à ces sites en raison de la complémentarité des séquences de bases de l'ARNt et du gène correspondant. Une situation similaire existe pour l'ARNr. Nous voyons donc que l'hypothèse un gène — une enzyme n'est pas toujours valable. Certains gènes ne codent pas pour des protéines ; au contraire, ils spécifient les ARN de l'appareil de traduction.

Message Certains gènes codent pour des protéines ; d'autres spécifient des ARN (ARNt et ARNr) en tant que produits finals.

Comment l'ARNt acquiert-il sa forme si particulière ? Il se replie probablement spontanément pour prendre une conformation qui offre la stabilité maximale. L'ARN de transfert contient de nombreuses bases *inhabituelles* ou modifiées (comme le pseudouracile, ψ) parmi ses nucléotides ; ces bases jouent un rôle spécifique dans le repliement et sont également impliquées dans d'autres fonctions de l'ARNt. Vous avez peut-être remarqué des appariements inhabituels dans les boucles des ARNt de la figure 13-17b ; un G est apparié à un U (au lieu d'un C). Cet appariement à première vue erroné sera discuté dans la section suivante.

De nouveaux mots codes

Les mots codes précis furent déchiffrés grâce à deux types d'expériences. La première comportait la préparation de «mini-ARNm» dont chacun ne comprenait que trois nucléotides. Ceux-ci sont évidemment trop courts pour promouvoir la traduction en protéines mais ils stimulent néanmoins la liaison des aminoacyl-ARNt (aa–ARNt) aux ribosomes dans une sorte de tentative de traduction avortée. Il est donc possible de synthétiser un mini-ARNm spécifique et de déterminer *quel* aminoacyl ARNt il va fixer aux ribosomes.

Par exemple, le problème des G + 2U discuté plus haut peut être résolu en utilisant les mini-ARNm suivants :

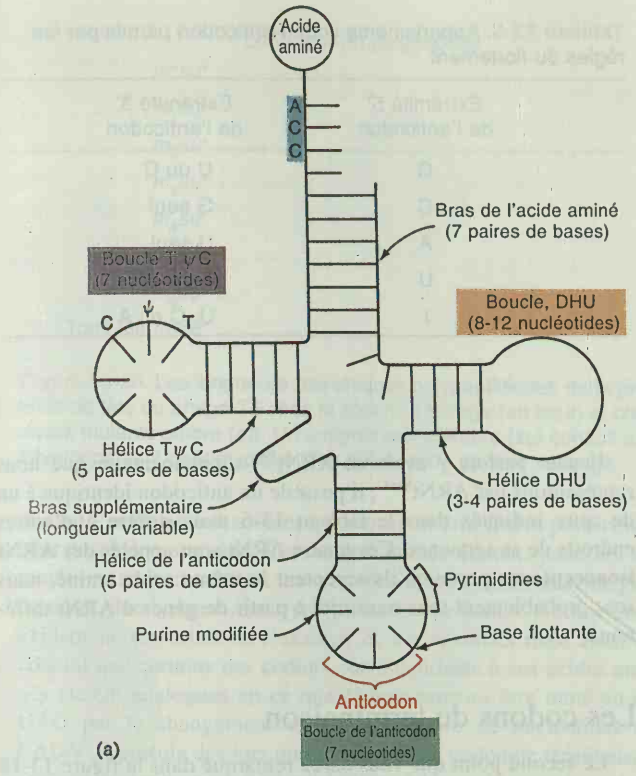
GUU — stimule la liaison du valyl-ARNt

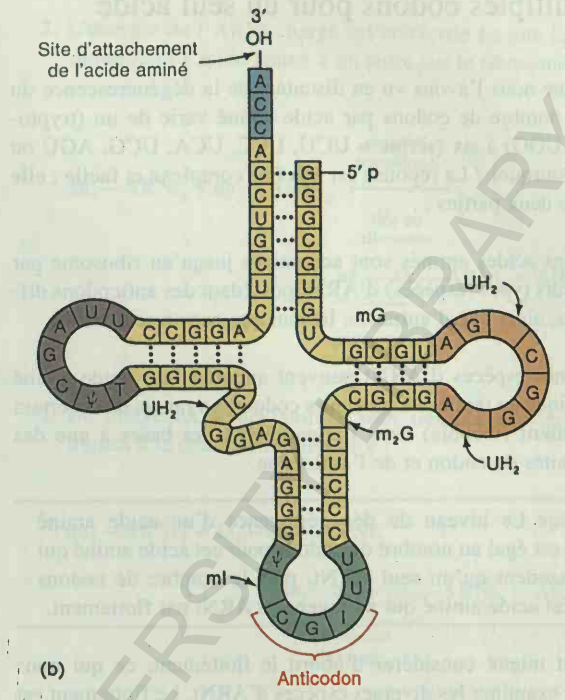
UUG — stimule la liaison du leucyl-ARNt

UGU — stimule la liaison du cystéinyl-ARNt

Des mini-ARN analogues permirent le déchiffrement presque complet des 64 (4^3) codons possibles.

Le deuxième type d'expériences qui fut utile pour déchiffrer le code génétique est celui des «copolymères répétitifs». Par exemple, le copolymère désigné $(AGA)_n$, qui correspond à une longue séquence de ...AGAAGAAGAAGAAGA..., fut utilisé pour promouvoir la synthèse in vitro de polypeptides. A partir de la séquence des polypeptides résultants et des triplets susceptibles d'être présents dans les copolymères d'ARN respectifs, il fut possible d'identifier un grand nombre de mots-codes. (Ce type d'expérience est décrit dans le problème 10, à la fin de ce chapitre. En





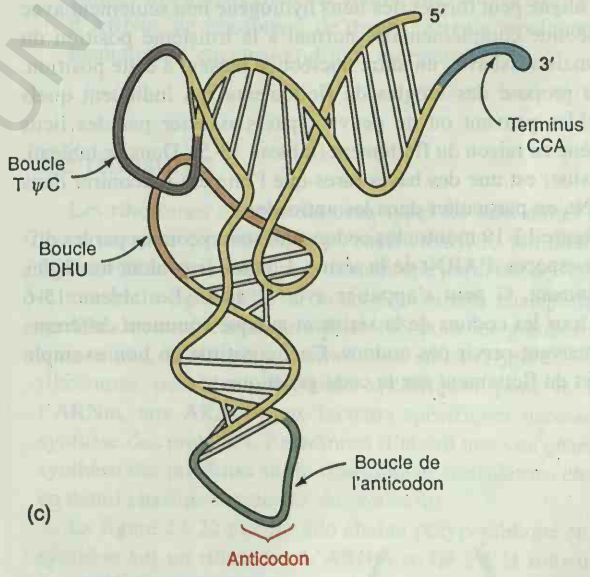


Figure 13-17. La structure de l'ARN de transfert. (a) Les régions fonctionnelles d'une molécule généralisée d'ARNt. (b) La séquence spécifique de l'ARNt de l'alanine chez la levure. Les flèches indiquent différents types de bases modifiées rares. (c) La structure tridimensionnelle de l'ARNt de la phénylalanine chez la levure. Les symboles ψ, mG, m_2G, ml et DHU (ou UH_2) sont des abréviations pour les bases modifiées pseudouridine, methylguanosine, dimethylguanosine, methylinosine et dihydrouridine, respectivement. (Partie (a) de S. Arnott «The structure of transfer RNA», *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 22, 1971, 186 ; parties (b) et (c) de L. Stryer, *Biochemistry*, 4ième éd. Copyright ©1995 par W. H. Freeman and Company ; la partie (c) est basée sur un dessin du Dr. Sung-Hou Kim.)

Deuxième lettre

Première lettre	U	C	A	G	Troisième lettre
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC Cys UGA Stop UGG Trp	U C A G
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	U C A G
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	U C A G
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	U C A G

Figure 13-18. Le code génétique.

le résolvant, vous vous mettrez à la place de H. Gobind Khorana qui reçut le Prix Nobel pour avoir réalisé ces expériences).

La figure 13-18 montre le dictionnaire des 64 mots du code génétique. Examinez soigneusement cette figure et méditez sur les miracles de la génétique moléculaire. Cet examen vous fera découvrir plusieurs points qui demandent encore à être expliqués.

MCGILL UNIVERSITY LIBRARY

De multiples codons pour un seul acide aminé

Comme nous l'avons vu en discutant de la dégénérescence du code, le nombre de codons par acide aminé varie de un (tryptophane = UGG) à six (sérine = UCU, UCC, UCA, UCG, AGU ou AGG). Pourquoi ? La réponse est à la fois complexe et facile ; elle comporte deux parties :

1. Certains acides aminés sont acheminés jusqu'au ribosome par plusieurs types (espèces) d'ARNt possédant des anticodons différents, alors que d'autres ne le sont que par un seul ARNt.

2. Certaines espèces d'ARNt peuvent apporter leur acide aminé spécifique en réponse à plusieurs codons, en raison d'un certain **flottement** (wobble) dans l'appariement des bases à une des extrémités du codon et de l'anticodon.

Message Le niveau de dégénérescence d'un acide aminé donné est égal au nombre de codons pour cet acide aminé qui ne possèdent qu'un seul ARNt, plus le nombre de codons pour cet acide aminé qui partagent un ARNt par flottement.

Il vaut mieux considérer d'abord le flottement, ce qui nous mènera à examiner les diverses espèces d'ARNt. Le flottement est provoqué par un alignement imparfait du troisième nucléotide (à l'extrémité 5') de l'anticodon (figure 13-19). Parfois, ce nucléotide mal aligné peut former des liens hydrogène non seulement avec le nucléotide complémentaire normal à la troisième position du codon mais aussi avec un autre nucléotide présent à cette position. Crick a proposé des «règles de flottement» qui indiquent quels nucléotides peuvent ou ne peuvent pas s'associer par des liens hydrogène en raison du flottement (tableau 13-5). Dans ce tableau, I (l'inosine) est une des bases rares que l'on peut rencontrer dans les ARNt, en particulier dans les anticodons.

La figure 13-19 montre les codons qui sont reconnus par les différentes espèces d'ARNt de la sérine. Comme le veulent les règles du flottement, G peut s'apparier avec U ou C. Le tableau 13-6 montre tous les codons de la sérine et indique comment différents ARNt peuvent servir ces codons. Ceci constitue un bon exemple de l'effet du flottement sur le code génétique.

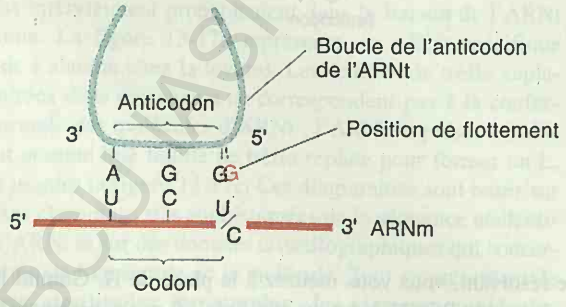


Figure 13-19. Au troisième site (à l'extrémité 5') de l'anticodon, le G peut osciller entre deux positions et est donc capable de s'apparier avec un U ou un C. Ceci signifie qu'une même espèce d'ARNt transportant un acide aminé (dans le cas présent, une sérine) peut reconnaître deux codons —UCU et UCC— dans l'ARNm.

Tableau 13-5. Appariements codon-anticodon permis par les règles du flottement

Extrémité 5' de l'anticodon	Extrémité 3' de l'anticodon
G	U ou C
C	G seul
A	U seul
U	A ou G
I	U, C ou A

Il peut parfois y avoir un $ARNt^{Ser}$ supplémentaire que nous représentons par $ARNt^{Ser4}$; il possède un anticodon identique à un de ceux indiqués dans le tableau 13-6 mais diffère à d'autres endroits de sa séquence. Ces quatre ARNt sont appelés des **ARNt isoaccepteurs** parce qu'ils acceptent le même acide aminé, mais sont probablement tous transcrits à partir de gènes d'ARNt différents.

Les codons de terminaison

Le second point que vous aurez remarqué dans la figure 13-18 c'est que certains codons ne spécifient aucun acide aminé. Ces codons sont appelés des **codons de terminaison** ou **codons stop.** On peut les considérer comme des points ou des virgules ponctuant le message codé par l'ADN.

Un des premiers indices de l'existence de codons de terminaison fut fourni en 1965 par le travail de Brenner sur le phage T4. Brenner analysa certaines mutations (m_1 à m_6) qui affectent l'unique cistron qui spécifie la protéine de tête du phage. Ces mutations avaient deux choses en commun. D'une part, les protéines de tête de phage de tous ces mutants comportaient des chaînes polypeptidiques plus courtes que celle de la souche sauvage. D'autre part, la présence d'une mutation suppresseur (*su*) dans le chromosome induisait la synthèse d'une chaîne peptidique de longueur normale (de type sauvage) malgré la présence des mutations *m* (figure 13-20).

Brenner examina les extrémités des protéines raccourcies et les compara avec celle de la protéine sauvage, en notant pour chaque

Tableau 13-6. Les différents ARNt qui peuvent reconnaître les codons de la sérine

Codon	ARNt	Anticodon
UCU UCC	$ARNt^{Ser}_1$	AGG + flottement
UCA UCG	$ARNt^{Ser}_2$	AGU + flottement
AGU AGC	$ARNt^{Ser}_3$	UCG + flottement

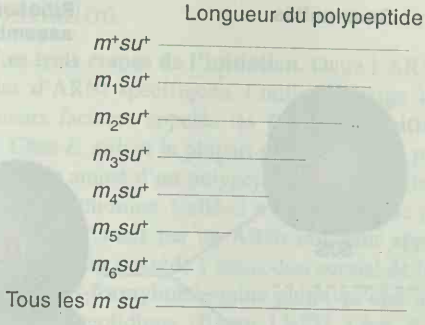


Figure 13-20. Les longueurs des chaînes polypeptidiques de la protéine de tête du phage T4 chez la souche sauvage (en haut) et chez divers mutants ambre (*m*). Un suppresseur d'ambre (*su*) conduit au développement phénotypique d'un polypeptide de type sauvage.

mutant l'acide aminé suivant qui *aurait dû* être inséré pour continuer la chaîne sauvage. Ces acides aminés étaient, pour les six mutations respectivement, une glutamine, une lysine, un acide glutamique, une tyrosine, un tryptophane et une sérine. Aucun motif évident ne ressortait de l'examen de ces résultats mais Brenner conclut que certains des codons correspondants à ces acides aminés étaient analogues en ce que chacun pouvait être muté en un UAG par le changement d'une seule paire de nucléotides de l'ADN. Il postula dès lors que UAG était un codon de terminaison (ou codon stop)—un signal qui indique à la machinerie de traduction que la protéine est complète.

Le codon UAG fut le premier codon de terminaison à être déchiffré ; on le désigne comme le **codon ambre**. Les mutants défectueux en raison de la présence d'un codon anormal ambre sont appelés des *mutants ambre*, leurs suppresseurs sont des *suppresseurs d'ambre ;* UGA, le **codon opale**, et UAA, le **codon ocre**, sont également des codons de terminaison qui ont leurs suppresseurs. Les codons stop sont souvent appelés des **codons non-sens** parce qu'ils ne désignent aucun acide aminé. On ne sera pas surpris de noter que les codons stop ne peuvent pas servir de mini-ARNm pour la liaison in vitro des aa–ARNt aux ribosomes. Nous reviendrons aux propriétés des codons stop et de leurs suppresseurs après avoir considéré le processus de synthèse des protéines.

La synthèse des protéines

Nous pouvons considérer la **synthèse des protéines** comme une réaction chimique et c'est à cet aspect que nous nous intéresserons en premier lieu. Ensuite, nous envisagerons, au niveau tridimensionnel, les interactions physiques qui interviennent entre les principaux éléments impliqués.

Dans la synthèse des protéines en tant que réaction chimique :

1. Chaque acide aminé (aa) est lié à une molécule spécifique d'ARNt par une liaison à haute énergie dérivée de l'ATP. Cette liaison est formée par une enzyme spécifique appelée **synthétase** (on dit que l'ARNt est «chargé» lorsque l'aa y est attaché) :

$$aa_1 + ARNt_1 + ATP \xrightarrow{\text{synthétase}_1} aa_1\text{—}ARNt_1 + AMP + PP_i$$

Il existe une synthétase spécifique pour chaque acide aminé.

2. L'énergie de l'ARNt chargé est convertie en une liaison peptidique liant l'acide aminé à un autre sur le ribosome :

$$aa_1\text{—}ARNt_1 + aa_2\text{—}ARNt_2 \xrightarrow[\text{liée au ribosome}]{\text{peptidyl transférase}} \underbrace{aa_1\text{—}aa_2}_{\text{Court polypeptide}}\text{—}ARNt_2 + ARNt_1 \text{ (libéré)}$$

3. De nouveaux acides aminés sont liés par des liaisons peptidiques à la chaîne en croissance :

$$aa_3\text{—}ARNt_3 + aa_1\text{—}aa_2\text{—}ARNt_2$$

$$\underbrace{aa_1\text{—}aa_2\text{—}aa_3}_{\text{Polypeptide plus long}}\text{—}ARNt_3 + ARNt_2 \text{ (libéré)}$$

4. Ce processus se poursuit jusqu'à ce que aa_n (le dernier acide aminé) soit ajouté. Bien sûr, toute l'opération exige la présence d'ARNm, de ribosomes, de divers facteurs protéiques supplémentaires, d'enzymes et d'ions inorganiques.

Le ribosome

Les ribosomes comportent deux types de sous-unités qui, chez les procaryotes, possèdent des coefficients de sédimentation de 50S et 30S et s'associent pour donner une particule de 70S, comme le montre la figure 13-21a. Leurs équivalents eucaryotiques présentent des coefficients de 60S et 40S pour les grandes et petites sous-unités, de 80S pour les ribosomes entiers (figure 13-21b). Les ribosomes possèdent des sites spécifiques pour la liaison à l'ARNm, aux ARNt et aux facteurs spécifiques nécessaires à la synthèse des protéines. Examinons d'abord une vue générale de la synthèse des protéines sur le ribosome et considérons ensuite plus en détail chacune des étapes du processus.

La figure 13-22 montre une chaîne polypeptidique en cours de synthèse sur un ribosome. L'ARNm se lie à à la sous-unité 30S. Les ARNt se lient à deux sites du ribosome qui sont à cheval sur les deux sous-unités. Le **site A** est le site d'entrée d'un aminoacyl-ARNt (un ARNt porteur d'un seul acide aminé). Le peptidyl-ARNt porteur de la chaîne polypeptidique en croissance se lie au **site P.** Chaque nouvel acide aminé est ajouté par le transfert de la chaîne en croissance sur le nouvel aminoacyl-ARNt en formant une nouvelle liaison peptidique. L'ARNt désacétylé est ensuite libéré du site P et le ribosome migre un codon plus loin le long du messager, en transférant le nouveau peptidyl-ARNt au site P et en laissant le site A vacant pour un nouvel aminoacyl-ARNt entrant.

Nous pouvons partager le processus de synthèse des protéines en trois étapes distinctes : l'**initiation,** l'**élongation** et la **terminaison.**

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

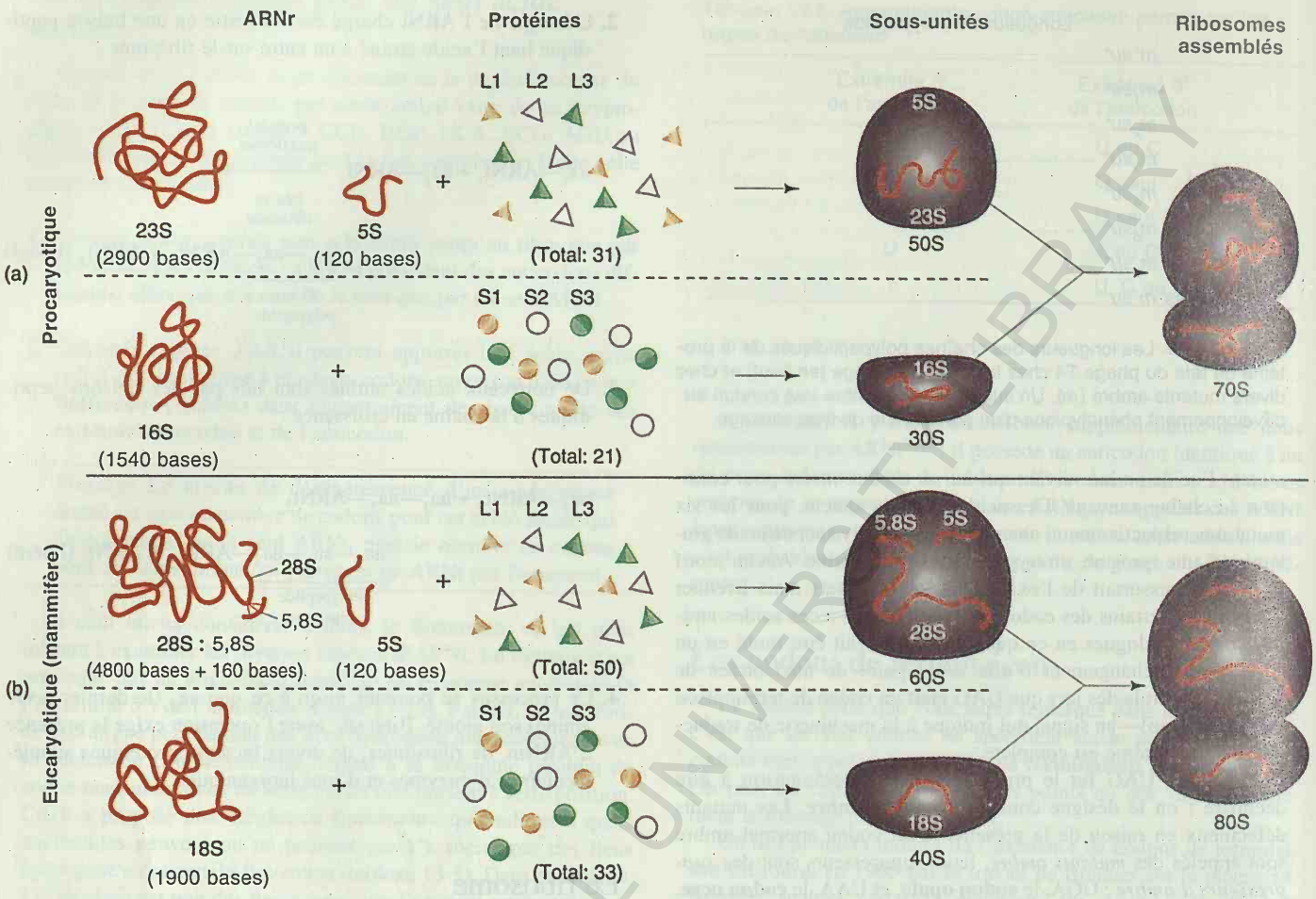


Figure 13-21. Les ribosomes contiennent une grande et une petite sous-unité. Chaque sous-unité contient des ARNr de longueurs variées et un ensemble de protéines (désignées par des teintes différentes). Il y a deux molécules d'ARNr principales dans tous les ribosomes. Les ribosomes procaryotiques contiennent en outre un ARNr de 120 bases qui sédimente avec un coefficient de 5S, tandis que les ribosomes eucaryotiques comportent deux petits ARNr : une molécule d'ARNr 5S analogue à l'ARNr 5S procaryotique et une molécule d'ARNr 5,8S de 160 bases. Les protéines de la grande sous-unité sont appelées L1, L2, etc., et celles de la petite sous-unité S1, S2, etc. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

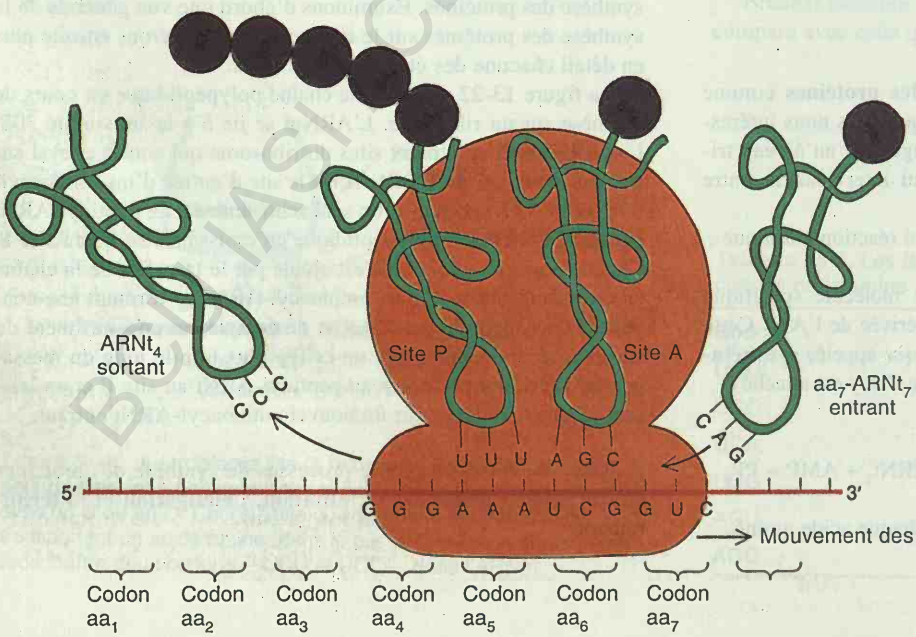


Figure 13-22. L'addition d'un acide aminé à la chaîne polypeptidique naissante au cours de la traduction de l'ARNm.

L'initiation

Les trois étapes de l'initiation. Outre l'ARNm, les ribosomes et des d'ARNt spécifiques, l'initiation exige la participation de plusieurs facteurs appelés les **facteurs d'initiation IF1, IF2** et IF3. Chez *E. coli* et la plupart des organismes procaryotes, le premier acide aminé d'un polypeptide néosynthétisé est toujours une *N*-formylméthionine. Celle-ci n'est pas insérée par l'intermédiaire d'un $ARNt^{Met}$ mais par un ARNt initiateur appelé $ARNt^{fMet}$. Cet ARNt initiateur possède l'anticodon normal de la méthionine mais insère une *N*-formylméthionine plutôt qu'une méthionine dans la chaîne polypeptidique (figure 13-23). Chez *E. coli*, les codons AUG, GUG et dans de rares cas UUG, peuvent servir de codon d'initiation. Lorsqu'un de ces triplets est présent en position d'initiation, il est reconnu par le *N*-formylMet–ARNt et une méthionine est le premier acide aminé de la chaîne. Examinons en détail ces étapes d'initiation.

1. La première étape de l'initiation correspond à la liaison de l'ARNm à la sous-unité 30S (figure13-24). Cette liaison est stimulée par le facteur IF3. Lorsqu'elles ne sont pas engagées dans la synthèse des protéines, les sous-unités ribosomiques se trouvent sous forme libre ; elles s'assemblent en ribosomes complets par suite de l'initiation

2. Le facteur d'initiation IF2 lie le GTP et le fMet-ARNt initiateur, et stimule la liaison du fMet-ARNt au complexe d'initiation, en le dirigeant vers le site P, comme le montre la partie centrale de la figure 13-24.

3. Une protéine ribosomique clive le GTP lié à IF2 et favorise l'assemblage des deux sous-unités ribosomiques (figure 13-24, en bas). A ce stade les facteurs IF2 et IF3 sont libérés. (Le rôle précis d'IF1 n'est pas tout à fait clair, bien qu'il semble impliqué dans le recyclage des ribosomes.)

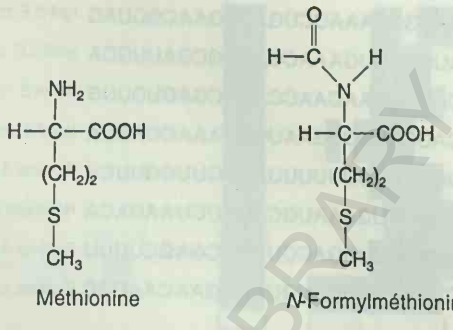


Figure 13-23. La structure de la méthionine (Met) et de la *N*-formylméthionine (fMet). Un ARNt porteur de fMet peut initier la synthèse d'une chaîne polypeptidique mais est incapable d'insérer une méthionine dans une chaîne en cours de croissance ; un ARNt porteur d'une méthionine peut insérer celle-ci dans la chaîne en croissance mais ne commencera pas la synthèse d'une nouvelle chaîne. Ces deux ARNt comportent le même anticodon complémentaire du codon AUG.

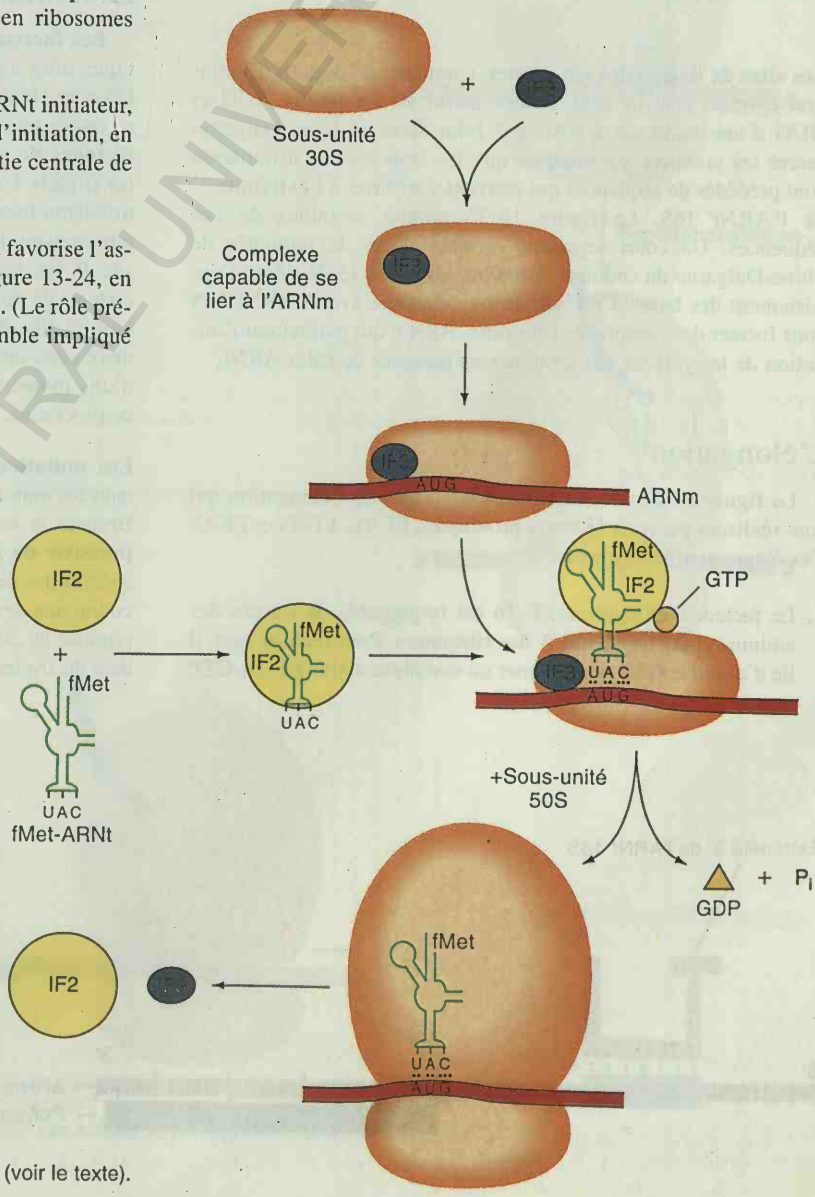


Figure 13-24. Les étapes de l'initiation de la traduction (voir le texte).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

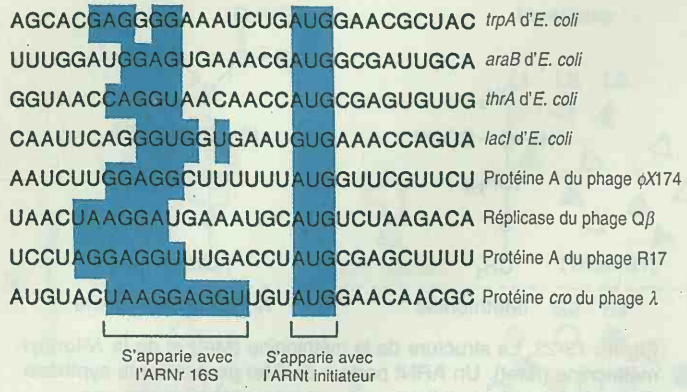


Figure 13-25. Les séquences des sites de liaison des ribosomes possèdent certaines caractéristiques communes qui sont montrées dans les régions colorées. Le codon d'initiation (en couleur) est séparé par plusieurs bases d'une courte séquence (en couleur) qui est complémentaire de l'extrémité 3' de l'ARNr 16S. (D'après L. Stryer, *Biochemistry*, 4ième éd. Copyright ©1995 par W. H. Freeman and Company.)

Les sites de liaison des ribosomes. Comment les codons d'initiation corrects sont-ils sélectionnés parmi les nombreux AUG et GUG d'une molécule d'ARNm ? John Shine et Lynn Dalgarno furent les premiers à remarquer que les vrais codons d'initiation sont précédés de séquences qui peuvent s'apparier à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S. La figure 13-25 montre certaines de ces séquences. Un court segmentt variable sépare la séquence de Shine-Dalgarno du codon d'initiation. La figure 13-26 décrit l'appariement des bases d'un ARNm hypothétique avec l'ARNr 16S pour former des complexes ribosome–ARNm qui permettent l'initiation de la synthèse des protéines en présence de fMet-ARNt.

L'élongation

La figure 13-27 décrit en détail les étapes de l'élongation qui sont réalisées par trois facteurs protéiques, EF-Tu, EF-Ts et EF-G. Ces étapes sont les suivantes :

1. Le facteur d'élongation EF-Tu est responsable de l'accès des aminoacyl-ARNt au site A des ribosomes. Pour réaliser ceci, il lie d'abord le GTP pour former un complexe activé EF-Tu-GTP qui se fixe à l'ARNt. Ensuite, l'hydrolyse du GTP de ce complexe en GDP favorise la liaison de l'aminoacyl-ARNt au site A et EF-Tu est libéré (figure 13-27a) en abandonnant le nouvel ARNt au site A (figure 13-27b).

2. Le facteur d'élongation EF-Ts assure la libération d'EF-Tu-GDP du ribosome ainsi que la régénération d'EF-Tu-GTP.

3. Dans l'étape de «translocation», la chaîne polypeptidique incluse dans le peptidyl-ARNt est transférée sur l'aminoacyl-ARNt présent au site A dans une réaction catalysée par la peptidyltransférase (figure 13-27c). Le ribosome effectue alors une translocation en se déplaçant d'un codon dans la direction 5'→3' le long de l'ARNm. Cette étape est catalysée par le facteur d'élongation EF-G (figure 13-27d) et est favorisée par le clivage du GTP en GDP. Ceci entraîne le détachement de l'ARNt non chargé du site A et le transfert du peptidyl-ARNt nouvellement formé du site A au site P du ribosome (figure 13-27e).

La terminaison

Les facteurs de relargage. Dans la discussion du code génétique, nous avons mentionné les trois codons terminateurs UAG, UAA et UGA. Chose intéressante, ces trois codons ne sont pas reconnus par un ARNt, mais par des facteurs protéiques appelés **facteurs de relargage**, abrégés en **RF1** et **RF2**. RF1 reconnaît les triplets UAA et UAG et RF2 les triplets UAA et UGA. Un troisième facteur, **RF3**, intervient également dans la réaction de terminaison de la chaîne. Lorsque le peptidyl-ARNt se trouve au site P, les facteurs de relargage, en réponse à la présence des codons de terminaison, se lient au site A. Le polypeptide est ensuite libéré du site P et les ribosomes se dissocient en leurs deux sous-unités, une réaction qui est favorisée par l'hydrolyse d'une molécule de GTP. La figure 13-28 présente un schéma de ce processus.

Les mutations suppresseur de non-sens. Considérons maintenant les mutations suppresseur de non-sens qui furent définies par Brenner et ses collaborateurs. Beaucoup de ces **mutations suppresseur de non-sens** altèrent la boucle de l'anticodon d'ARNt spécifiques de manière à rendre ceux-ci capables de reconnaître un codon non-sens dans l'ARNm. Ainsi, un acide aminé est inséré en réponse au codon de terminaison, et la traduction se poursuit au-delà du triplet. Dans la figure 13-29, une mutation ambre rempla-

Figure 13-26. Liaison de la séquence de Shine-Dalgarno de l'ARNm à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S. (D'après L. Stryer, *Biochemistry*, 4ième éd. Copyright ©1995 by W. H. Freeman and Company).

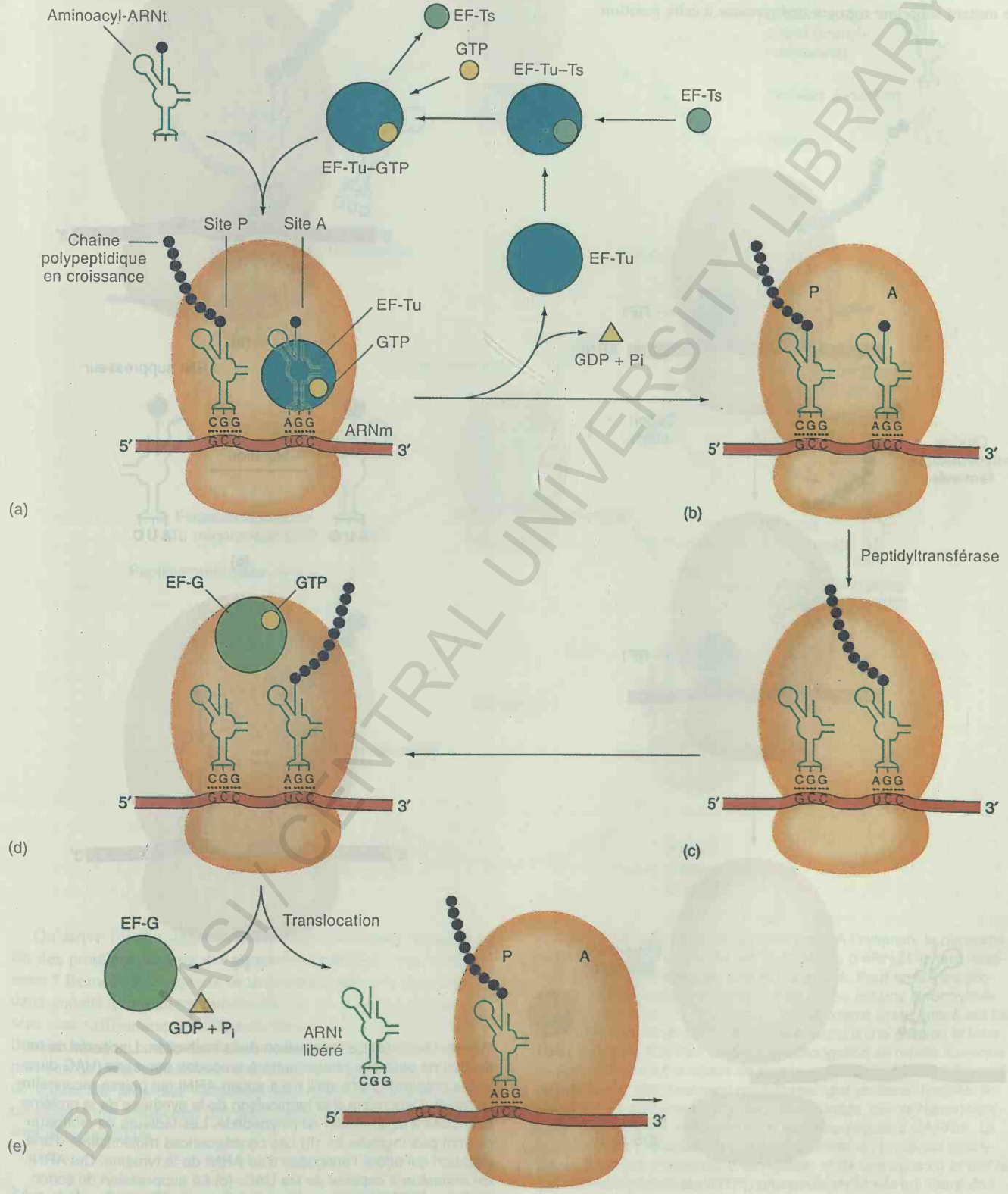


Figure 13-27. Les étapes de l'élongation (voir le texte)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ce un codon de type sauvage par le codon non-sens UAG. A lui seul, le codon UAG interromprait prématurément la protéine à cette position. Dans ce cas-ci, la mutation suppresseur produit un $ARNt^{Tyr}$ dont l'anticodon reconnaît le codon stop UAG du mutant. Le mutant supprimé contient une tyrosine à cette position.

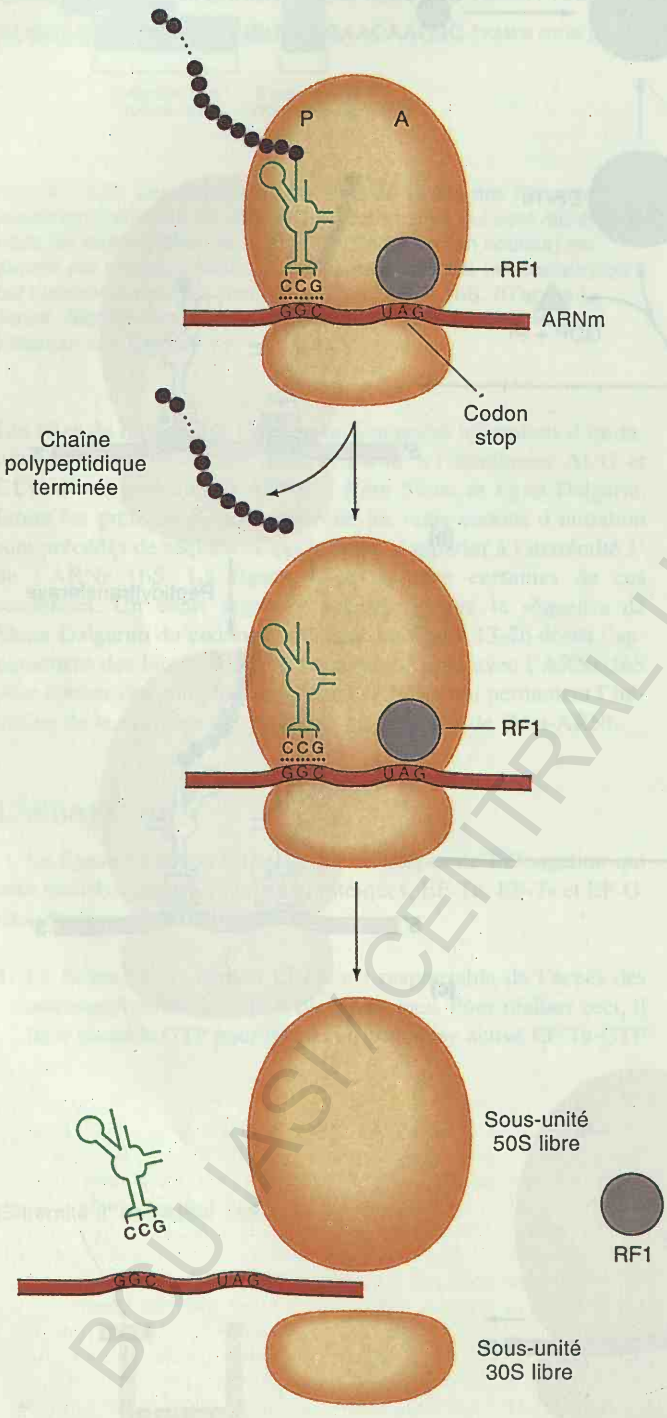


Figure 13-28. Les étapes qui conduisent à la terminaison de la synthèse des protéines (voir le texte).

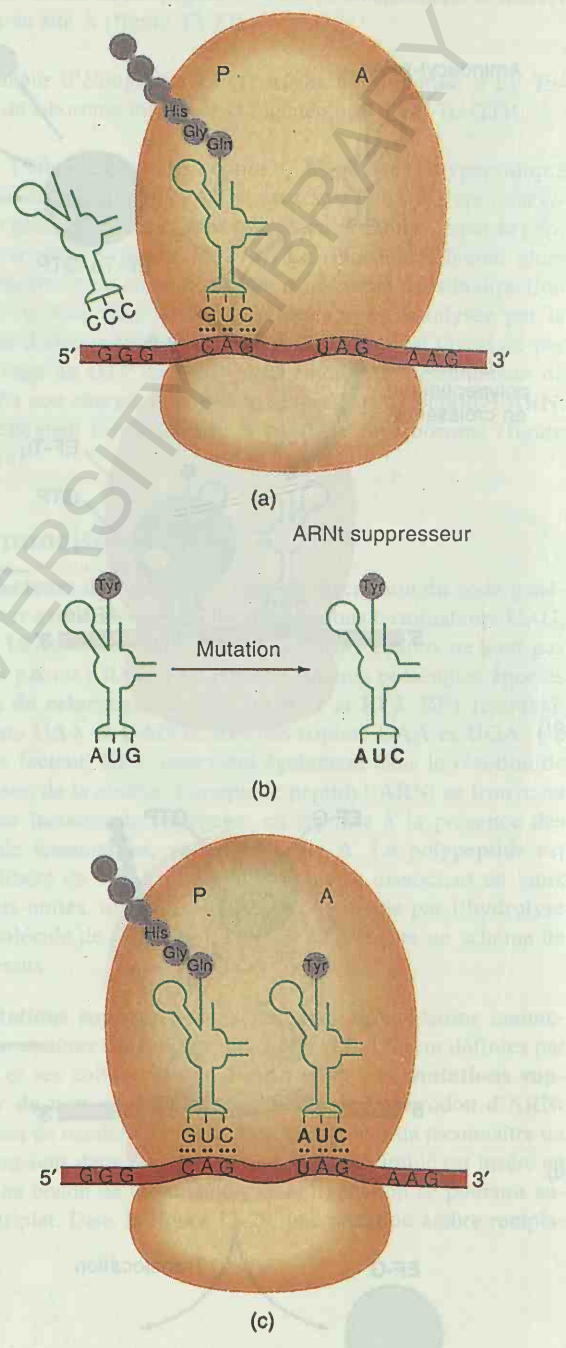
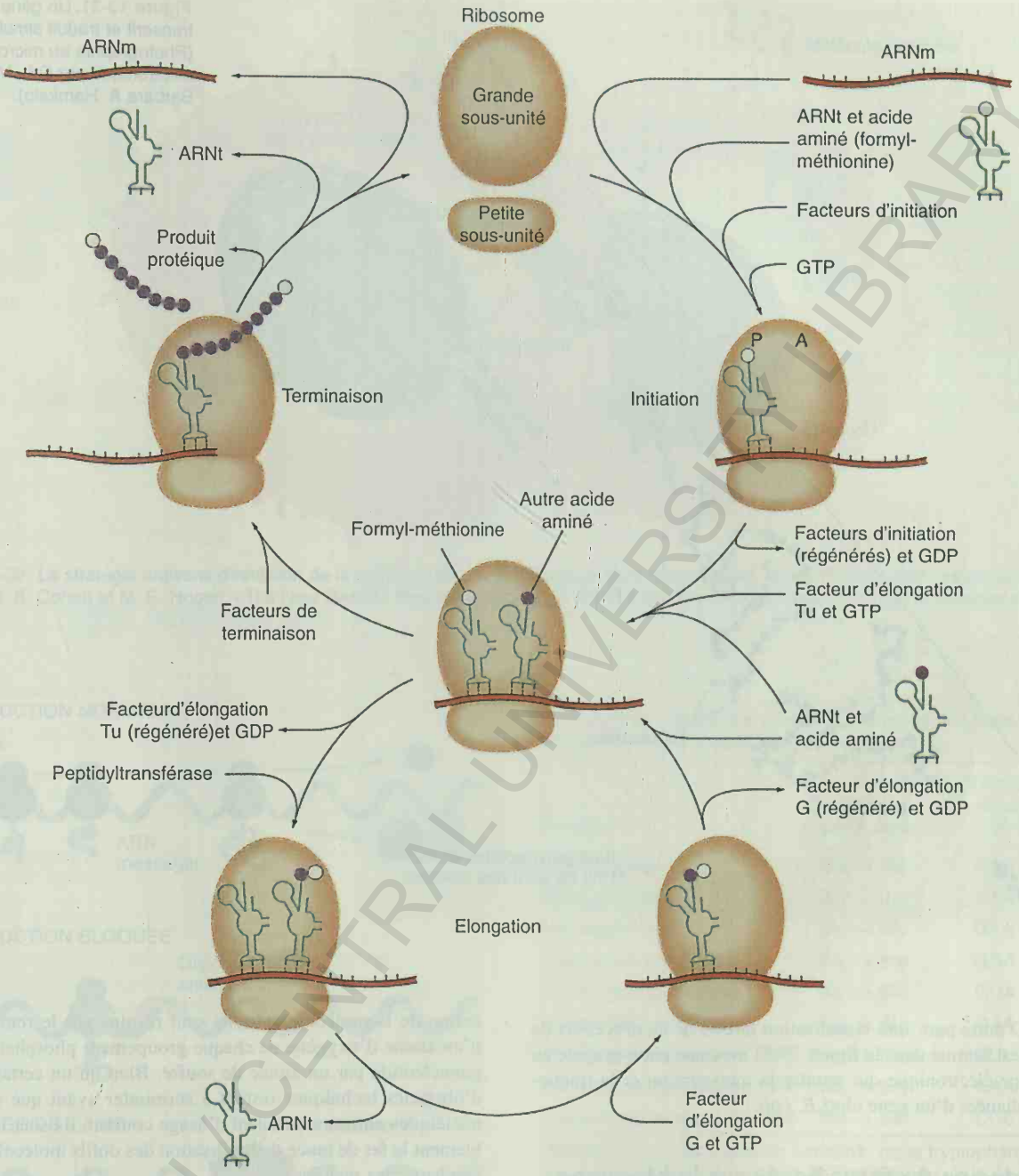


Figure 13-29. (a) La terminaison de la traduction. L'appareil de traduction ne peut pas passer outre à un codon non-sens (UAG dans le cas présent), parce qu'il n'y a aucun ARNt qui puisse reconnaître ce triplet. Ceci mène à la terminaison de la synthèse de la protéine et ensuite à la libération du polypeptide. Les facteurs de relargage ne sont pas montrés ici. (b) Les conséquences moléculaires d'une mutation qui altère l'anticodon d'un ARNt de la tyrosine. Cet ARNt est maintenant capable de lire UAG. (c) La suppression du codon UAG par l'ARNt altéré qui permet maintenant l'élongation de la chaîne. (Adapté de James D. Watson, John Tooze et David T. Kurtz, *Recombinant DNA : A short Course*. Copyright ©1983 par W. H. Freeman and Company.)

BOU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Qu'arrive-t-il aux signaux de terminaison normaux indiquant la fin des protéines lorsque des suppresseurs de non-sens sont présents ? Beaucoup de signaux de terminaison naturels consistent en deux codons terminateurs successifs. Or, les suppresseurs de non-sens sont suffisamment inefficaces dans la poursuite de la traduction au delà d'un codon terminateur pour que la probabilité de suppression de deux codons non-sens successifs soit faible. Très peu de copies de protéines contenant des acides aminés anormaux résultant d'une traduction qui passe outre à un codon stop naturel sont donc produites.

Un survol de la synthèse des protéines

La figure 13-30 présente un résumé des différentes étapes de la synthèse des protéines que nous avons passées en revue dans cette

Figure 13-30. Les fonctions du ribosome. A l'initiation, le ribosome reconnaît le point de départ sur la molécule d'ARN et lie une molécule d'ARNt porteuse d'un seul acide aminé. Pour toutes les protéines bactériennes, ce premier acide aminé est une N-formylméthionine. Au cours de l'élongation, un deuxième acide aminé est fixé au premier. Le ribosome se déplace ensuite d'une position le long de la molécule d'ARNm et le cycle d'élongation se répète. Lorsque le ribosome atteint le codon de terminaison, la chaîne d'acides aminés se replie spontanément pour former une protéine. Ensuite, le ribosome se dissocie en ses deux sous-unités, qui se réassocient avant d'entamer la traduction d'un nouveau segment d'ARNm. La synthèse des protéines est facilitée par diverses protéines catalytiques (facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison) et par le guanosine triphosphate (GTP), une petite molécule qui libère de l'énergie lorsqu'elle est convertie en guanosine diphosphate (GDP). (Adapté de Donald M. Engelman et Peter B. Moore, «Neutron-Scattering Studies of the Ribosome». Copyright ©1976 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés).

BIBLIOTHÈQUE CENTRALE UNIVERSITÉ LAVAL

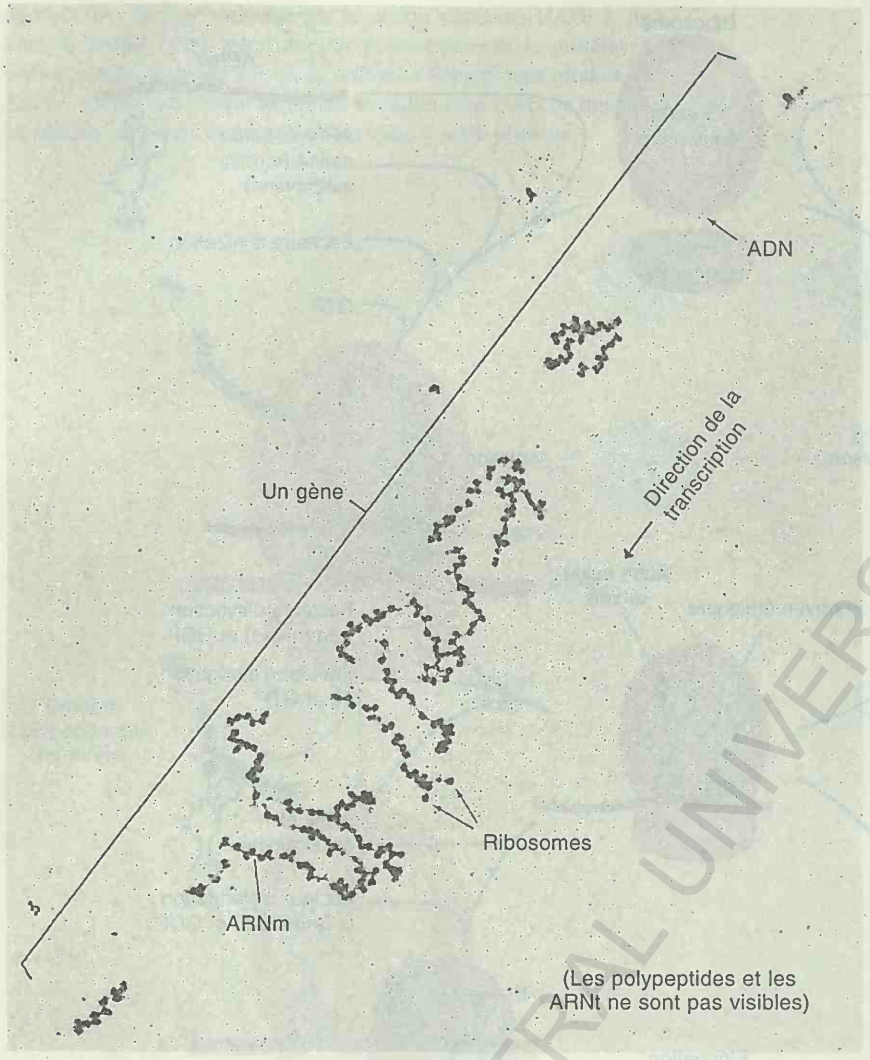


Figure 13-31. Un gène d'*E. coli* transcrit et traduit simultanément. (Photographie au microscope électronique par O.L. Miller, Jr, et Barbara A. Hamkalo).

section. D'autre part, une visualisation directe de ce processus de synthèse est fournie dans la figure 13-31 avec une photographie au microscope électronique qui montre la transcription et la traduction simultanées d'un gène chez *E. coli*.

La médecine du futur basée sur le bloquage de la traduction

De courts oligonucléotides, des segments d'ADN de 15 à 25 bases, sont actuellement utilisés à titre expérimental pour lutter contre le SIDA, la leucémie et diverses autres maladies. Le principe sur lequel repose l'utilisation de ces oligonucléotides antisens comme on les appelle est qu'ils se lient à la région initiale d'un ARN messager, par exemple les ARNm de l'herpes ou de HIV, et forment une double hélice, ce qui bloque la traduction de cet ARNm. Le court ADN antisens est conçu pour être rigoureusement complémentaire de de la séquence de l'ARNm. La figure 13-32 décrit cette stratégie. Parfois aussi, la portion à double brin de l'ARNm formée par la liaison du médicament antisens sert de cible pour la ribonucléase H, une enzyme cellulaire qui clive l'ARNm et empêche la traduction de se poursuivre, comme le montre la figure 13-33. Les problèmes d'insolubilité et de dégradation de la molécule antisens sont résolus par le remplacement d'un atome d'oxygène de chaque groupement phosphate de l'oligonucléotide par un atome de soufre. Bien qu'un certain nombre d'obstacles techniques restent à surmonter avant que ces acides nucléiques antisens ne soient d'usage courant, ils sont incontestablement le fer de lance de l'utilisation des outils moléculaires pour combattre les maladies.

L'universalité du transfert de l'information génétique

Jusqu'à présent, notre propos s'est focalisé sur les microbes mais ce qui est étonnant, c'est que les processus de transfert et de codage de l'information aussi bien que ceux de la traduction sont pratiquement identiques chez tous les organismes qui ont été étudiés à ce jour. Par exemple, toutes les substitutions connues d'un seul acide aminé de l'hémoglobine humaine résultent du changement d'une seule paire de nucléotides sur la base du code génétique dérivé d'*E. coli* (tableau 13-7). De telles observations suggèrent que le code génétique est commun à tous les organismes. De plus, des molécules à contenu informationnel comme les ARNm

TEL AVIV UNIVERSITY / CENTRAL LIBRARY

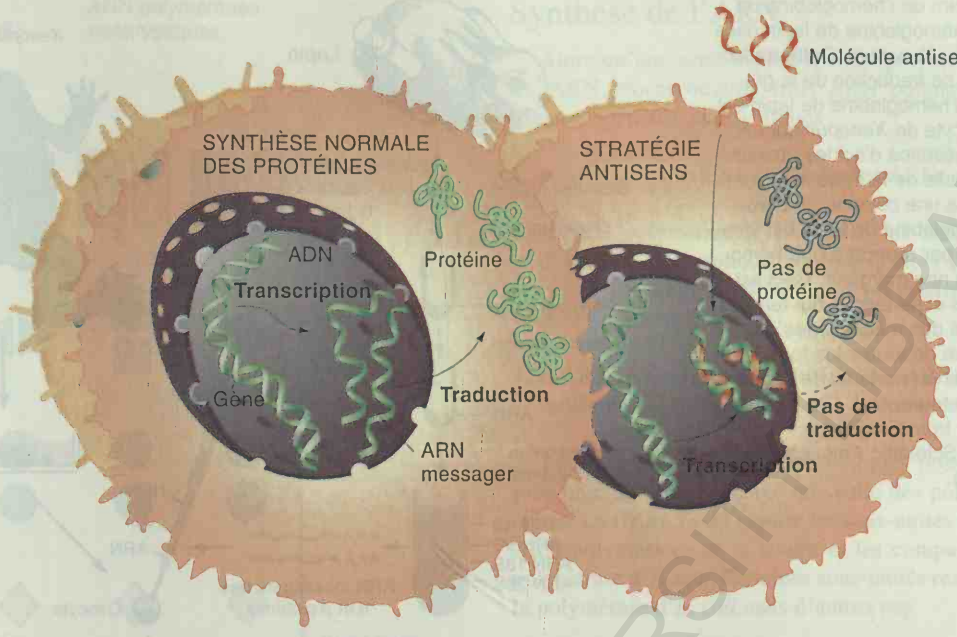


Figure 13-32. La stratégie antisens d'inhibition de la synthèse de protéines associées à des maladies vise à inhiber sélectivement la traduction. (De J. S. Cohen et M. E. Hogan, «The New Genetic Medicines» Copyright ©1994 par Scientific American, Inc.Tous droits réservés.)

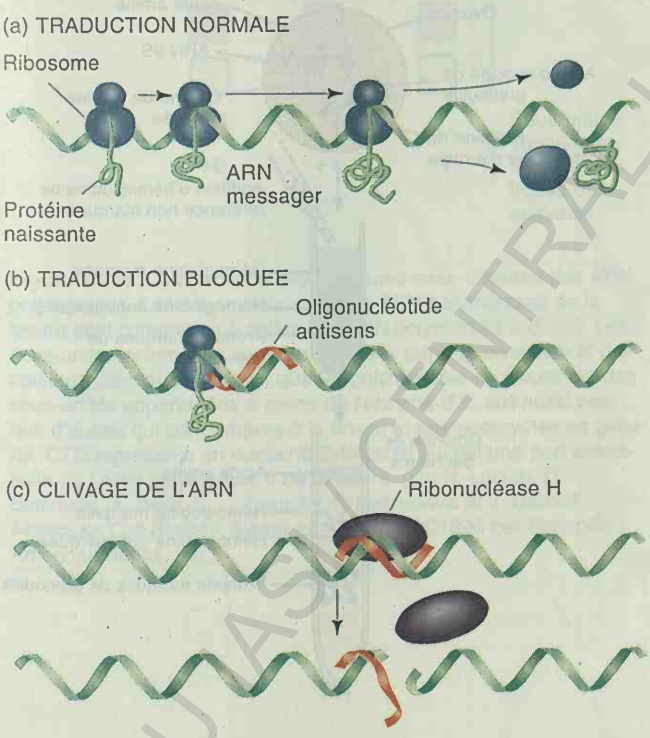


Figure 13-33. L'action d'un oligonucléotide antisens. La traduction normale (a) peut être inhibée par un oligonucléotide antisens (b). La liaison d'une molécule antisens peut aussi provoquer le clivage de l'ARN par la ribonucléase H, une enzyme, au site de liaison de la molécule (c). L'ARN clivé est ensuite rapidement dégradé. (De J. S. Cohen et M. E. Hogan, «The New Genetic Medicines ;» Copyright ©1994 par Scientific American, Inc.Tous droits réservés.)

Tableau 13-7. Mutations affectant différentes protéines et les changements de codons qu'elles entraînent

Protéine*	Substitution d'acide aminé	Déduction du changement de codon
Hémoglobine	Glu → Val	GAA → GUA
Hémoglobine	Glu → Lys	GAA → AAA
Hémoglobine	Glu → Gly	GAA → GGA
Tryptophan synthétase	Gly → Arg	GGA → AGA
Tryptophan synthétase	Gly → Glu	GGA → GAA
Tryptophan synthétase	Glu → Ala	GAA → GCA
Protéine de manteau du TMV	Leu → Phe	CUU → UUU
Protéine de manteau du TMV	Glu → Gly	GAA → GGA
Protéine de manteau du TMV	Pro → Ser	CCC → UCC

*Mutations de l'hémoglobine humaine, de la tryptophane synthétase d'*E. coli* et de la protéine de manteau du virus de la mosaïque du tabac (TMV).

SOURCE : L. Stryer, *Biochemistry,* 2ième éd. Copyright ©1981 by W. H. Freeman and Company.

des globules rouges de lapin où le transcrit des gènes de l'hémoglobine prédominent, peuvent être traduits en hémoglobine de lapin dans un environnement étranger comme l'œuf de grenouille (figure 13-34). L'appareil traducteur semble donc être le même dans une large gamme d'organismes différents.

Les déterminations de séquences aux niveaux de la protéine, de l'ARN et de l'ADN (voir le chapitre 14) ont confirmé que le code

BCU AS LCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

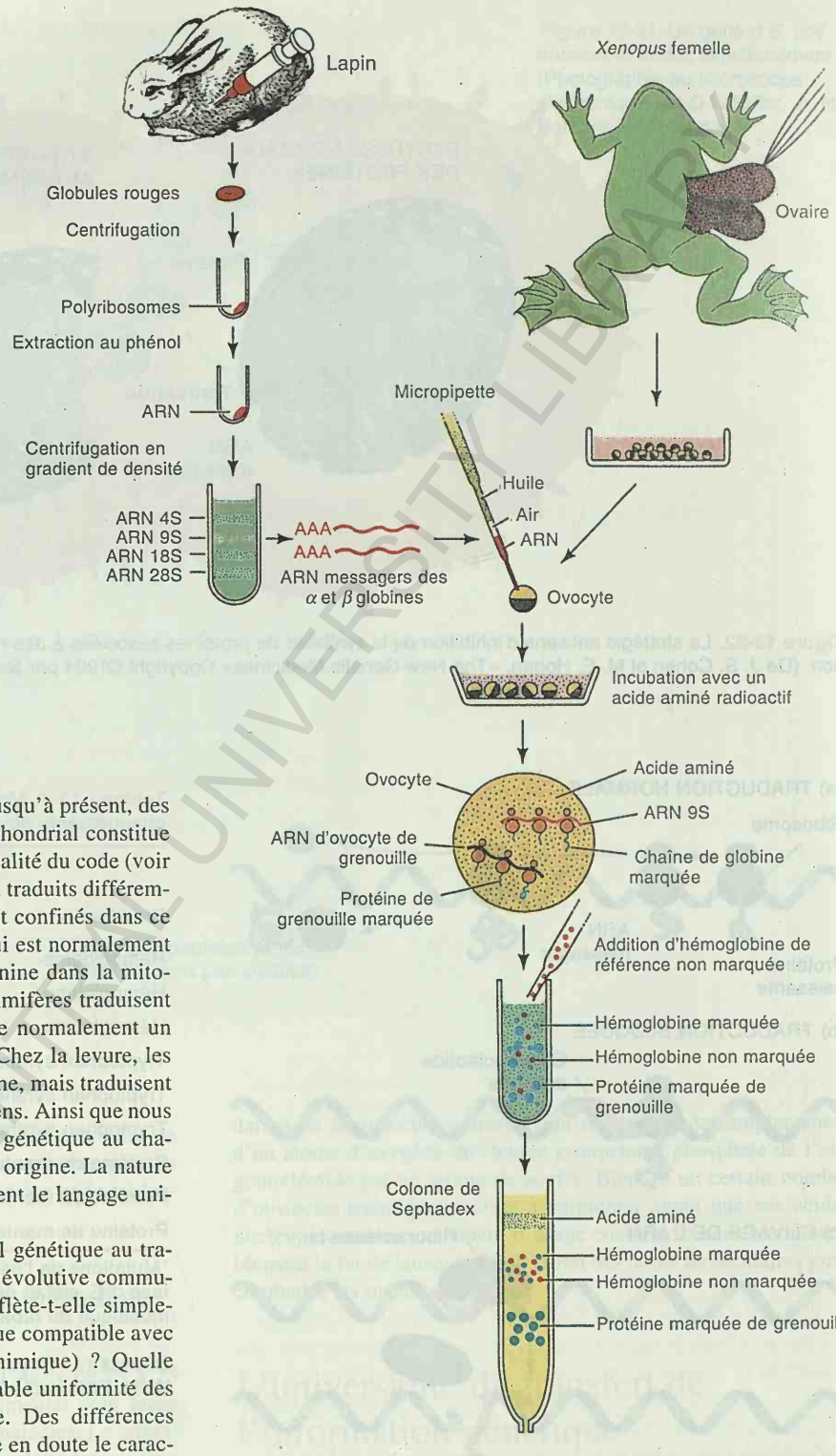


Figure 13-34. L'ARNm de l'hémoglobine de lapin est traduit en hémoglobine de lapin dans un œuf de grenouille (*Xenopus*). Cette traduction utilise l'appareil de traduction de la grenouille. L'ARNm de l'hémoglobine de lapin est injecté dans un ovocyte de *Xenopus* qui est ensuite incubé en présence d'acides aminés radioactifs. Les produits de la traduction sont ensuite séparés dans une colonne de chromatographie. L'hémoglobine de lapin est identifiée par sa position par rapport à une hémoglobine de référence non marquée. Ceci est une des nombreuses expériences qui tendent à montrer l'uniformité des mécanismes de la génétique moléculaire de toutes les formes de vie. (Le Sephadex est un matériel de séparation utilisé en chromatographie). (De C. Lane, «Rabbit Hemoglobin from Frog Eggs.» Copyright ©1976 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés).

est identique chez tous les organismes étudiés jusqu'à présent, des virus et des bactéries à l'homme. L'ADN mitochondrial constitue toutefois une exception à cette règle de l'universalité du code (voir aussi le chapitre 22) puisque deux codons y sont traduits différemment sur la base des propriétés d'ARNt qui sont confinés dans ce système mitochondrial. C'est ainsi que AUA qui est normalement traduit en isoleucine, est lu comme une méthionine dans la mitochondrie. De même, les mitochondries de mammifères traduisent UGA en tryptophane, alors qu'UGA représente normalement un codon de terminaison de la chaîne peptidique. Chez la levure, les mitochondries lisent UGA comme un tryptophane, mais traduisent AUA en isoleucine comme les systèmes bactériens. Ainsi que nous le verrons au cours d'expériences d'ingénierie génétique au chapitre 15, l'ADN est de l'ADN quelque soit son origine. La nature de l'ADN et le message qu'il contient constituent le langage universel de la vie sur terre.

Cette équivalence des éléments de l'appareil génétique au travers des espèces est-elle l'indice d'une origine évolutive commune à toutes les formes de vie terrestre ? Ou reflète-t-elle simplement le fait que c'est la seule option biochimique compatible avec l'environnement terrestre (déterminisme biochimique) ? Quelle que soit la réponse à cette question, la remarquable uniformité des bases moléculaires de la vie est bien établie. Des différences mineures existent mais ne suffisent pas à mettre en doute le caractère universel du mécanisme que nous venons de décrire.

Message Les processus de stockage de l'information, aussi bien que de réplication, de transcription et de traduction sont fondamentalement analogues chez tous les êtres vivants. Avec cette observation, la génétique moléculaire a joué un rôle unificateur essentiel en biologie. Nous connaissons maintenant certains des procédés qu'utilise la vie pour maintenir l'ordre dans un univers qui tend au désordre.

L'ARN eucaryotique

Plusieurs aspects de la synthèse et de la maturation des ARN chez les eucaryotes diffèrent notablement de ceux des procaryotes.

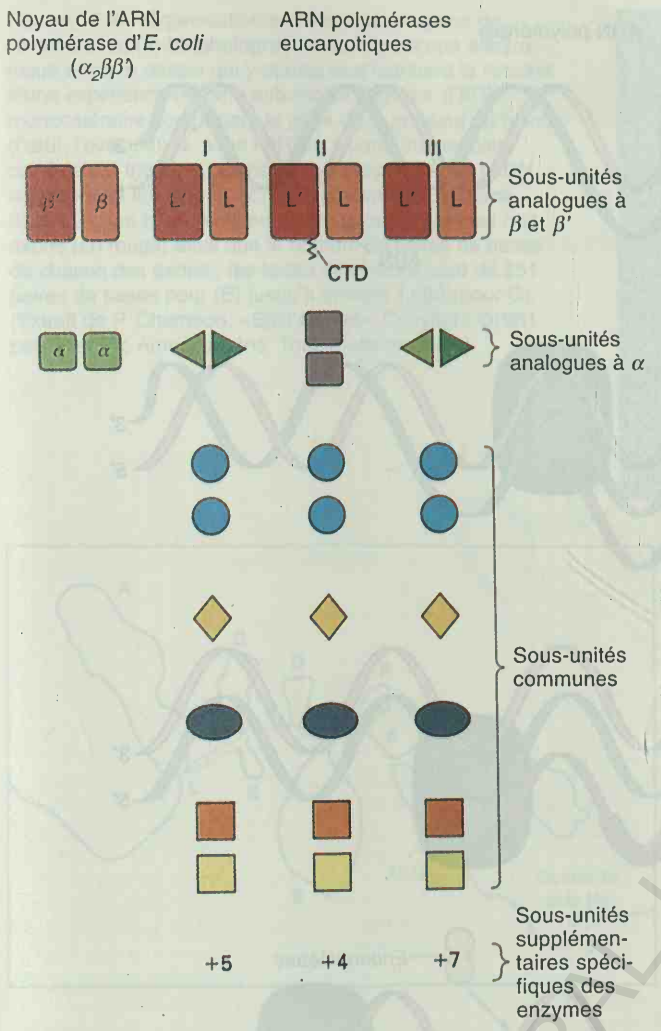


Figure 13-35. Comparaison des structures sous-unitaires des ARN polymérases. Les sous-unités des trois ARN polymérases de la levure sont comparées à celles de l'ARN polymérase d'*E. coli*. Les sous-unités communes sont représentées par des symboles et des couleurs identiques. On voit que les polymérases de levure ont des sous-unités apparentées à celles de l'enzyme d'*E. coli* aussi bien que d'autres qui sont propres à la levure et aux eucaryotes en général. CTD représente un domaine C-terminal qui est une part essentielle de l'ARN polymérase II de la levure. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

Synthèse de l'ARN

Alors qu'une seule espèce d'ARN polymérase synthétise tous les ARN procaryotiques, trois ARN polymérases interviennent dans les systèmes eucaryotiques :

1. L'ARN polymérase I synthétise les ARNr.
2. L'ARN polymérase II synthétise les ARNm. Les molécules d'ARNm sont **monocistroniques,** alors que chez les procaryotes beaucoup d'ARNm sont **polycistroniques** (correspondent à plusieurs cistrons).
3. L'ARN polymérase III synthétise les ARNt ainsi que de petites molécules d'ARN nucléaires et cellulaires.

Les ARN polymérases eucaryotiques possèdent une structure sous-unitaire plus complexe que celle des polymérases procaryotiques. La figure 13-35 montre les sous-unités de chacune des trois ARN polymérases de la levure et les compare avec celles de la polymérase d'*E. coli*. Certaines sous-unités ressemblent à celles de la polymérase d'*E. coli* mais d'autres pas.

La maturation de l'ARN

Le transcrit d'ARN primaire produit dans le noyau subit habituellement diverses formes de maturation avant d'être transporté dans le cytoplasme où il sert à programmer la machinerie de traduction (figure 13-36). La figure 13-37 décrit ces événements en

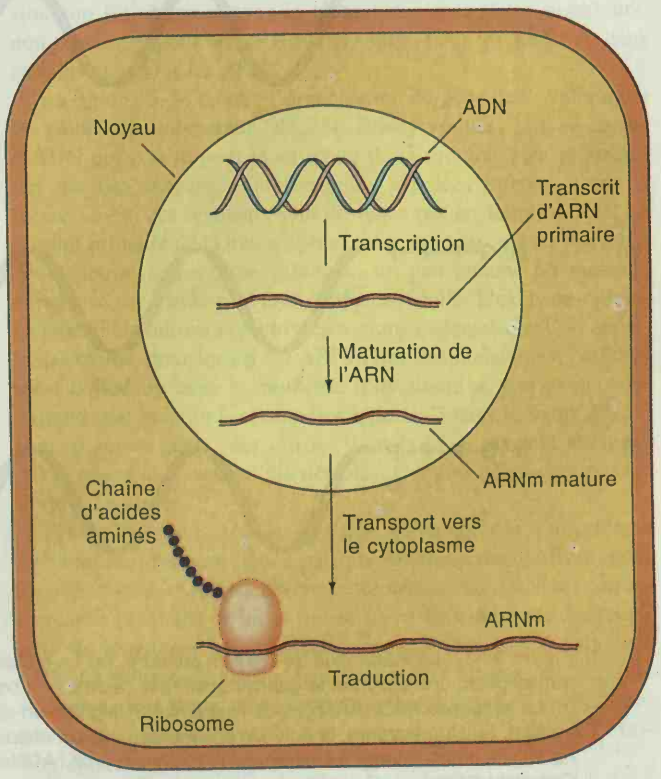
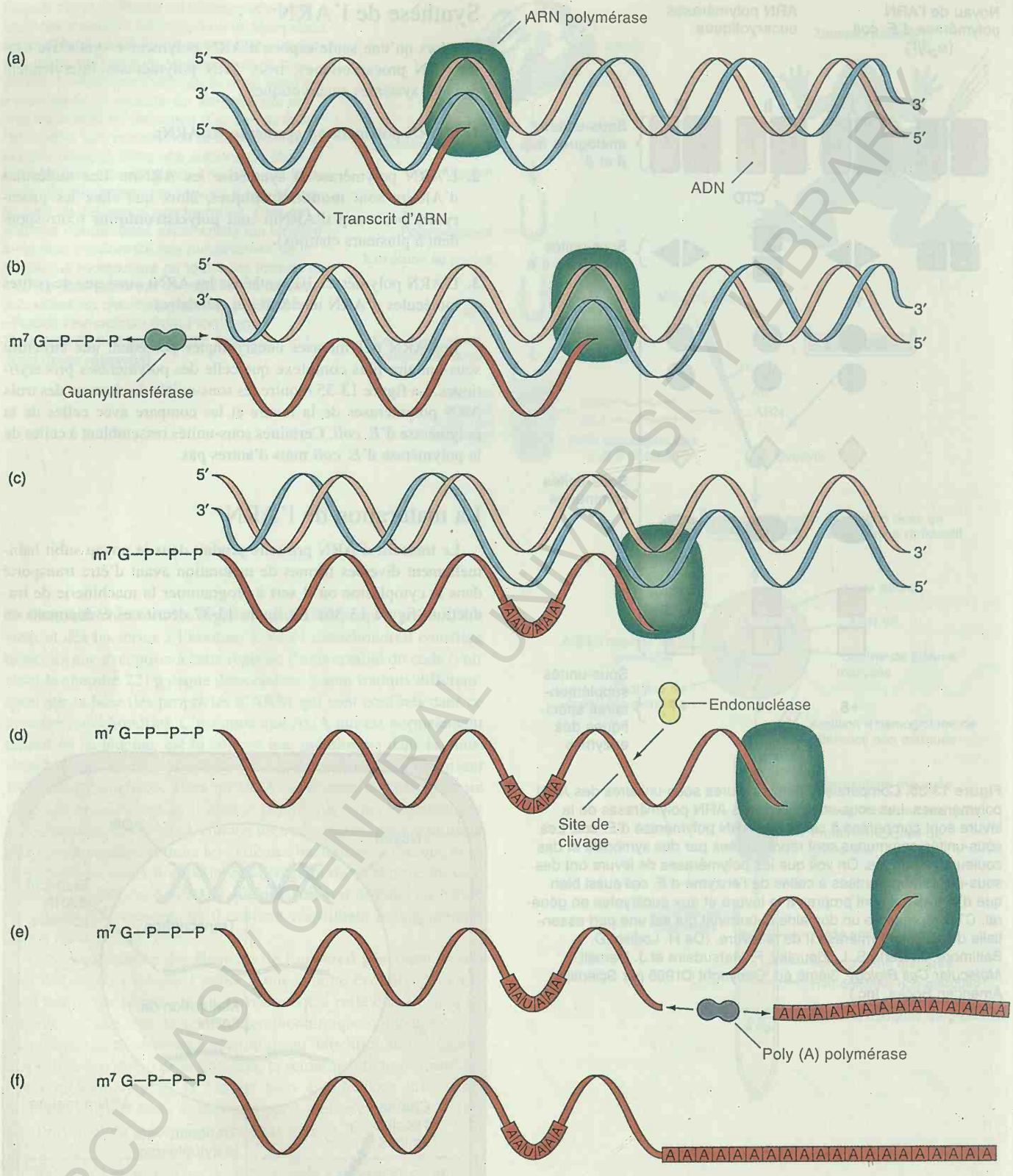


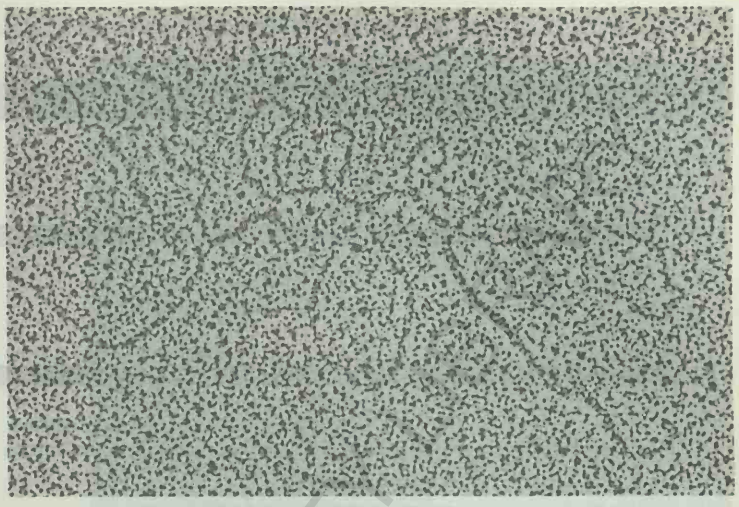
Figure 13-36. L'expression des gènes chez les eucaryotes. L'ARNm subit une maturation dans le noyau avant son transfert dans le cytoplasme. (Extrait de J. E. Darnell, Jr. «The processing of RNA.» Copyright ©1983 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés).

BCU IASI



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 13-37. La maturation de l'ARNm primaire. (a) La transcription est exécutée par l'ARN polymérase. (b) Au début de la transcription, une enzyme, la guanyltransférase, ajoute une coiffe de 7-méthylguanosine (m^7-Gppp) à l'extrémité 5' de l'ARNm. (c) La séquence AAUAAA, près de l'extrémité 3', signale un clivage (d) par une endonucléase qui aura lieu environ 20 bases en aval. (e) Une enzyme, la poly (A) polymérase, ajoute ensuite une queue de poly (A) comportant 150 à 200 résidus adénosine au site de ce clivage à l'extrémité 3'. (f) Ceci fournit l'ARNm complet. (De J. E. Darnell, Jr., «The processing of RNA.» Copyright ©1983 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)



(a)

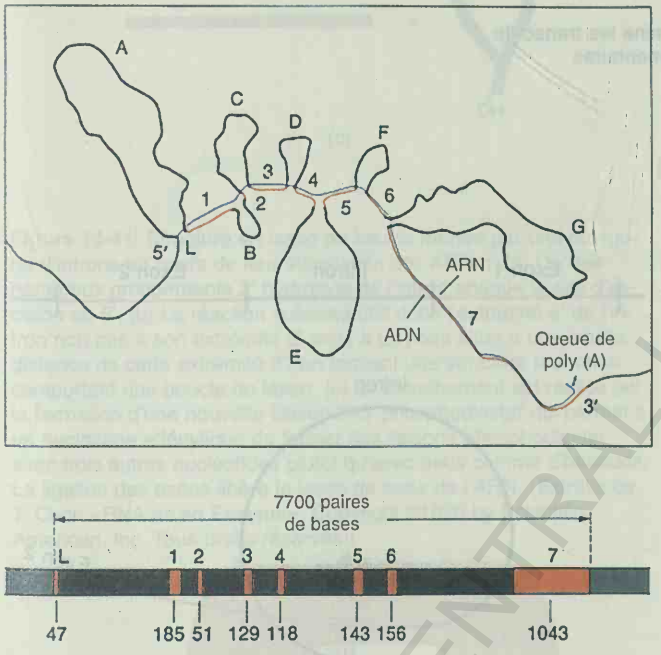


Figure 13-38. Organisation en mosaïque du gène de l'ovalbumine. (a) La photographie au microscope électronique et (b) le dessin qui y correspond montrent le résultat d'une expérience où on a hybridé un segment d'ADN monocaténaire comportant le gène de la protéine du blanc d'œuf, l'ovalbumine, avec l'ARNm à partir duquel cette protéine est traduite. Les boucles à simple brin de l'ADN représentent les introns. (c) La représentation schématique du gène montre les sept introns (en noir) et les huit exons (en rouge) ainsi que le nombre de paires de bases de chacun des exons ; les tailles des introns vont de 251 paires de bases pour (B) jusqu'à environ 1.600 (pour G). (Extrait de P. Chambon, «Split Genes». Copyright ©1981 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés).

détail. En premier lieu, une **coiffe** (cap), consistant en un résidu de 7-méthylguanosine lié à l'extrémité 5' du transcrit par une liaison triphosphate, est ajoutée au cours de la transcription. Ensuite, des segments de résidus adénosine sont attachés à l'extrémité 3'. Ces **queues de poly (A)** sont longues de 150 à 200 résidus. Après ces modifications une étape d'**excision-épissage** (splicing) enlève des portions internes de l'ARNm. La mise en évidence de ce processus, ainsi que la constatation que les séquences codantes des gènes sont interrompues par des «séquences intervenantes» — ces gènes ont reçu le nom de «gènes en morceaux» ou «gènes mosaïques» — représente une des découvertes les plus importantes de la génétique moléculaire au cours de la dernière décennie.

Les gènes mosaïques

L'étude des transcrits de l'ADN de virus de mammifères suggéra tout d'abord un manque de correspondance entre la carte génétique et les molécules d'ARNm. Lorsque les techniques de l'ADN recombinant (voir au chapitre 14) rendirent plus aisée l'analyse physique des gènes eucaryotiques, il apparut que les transcrits d'ARN *primaires* étaient raccourcis par l'élimination de fragments internes avant leur transport vers le cytoplasme. Cette situation fut observée chez la plupart des eucaryotes supérieurs, non seulement pour les ARNm, mais aussi pour les ARNr et, dans certains cas, pour les ARNt.

La figure 13-38 montre l'organisation du gène de l'ovalbumine de poule, un polypeptide de 386 acides aminés. Les segments d'ADN qui codent pour la structure de la protéine sont interrompus par des séquences intervenantes appelées **introns.** Dans la figure 13-38, ces segments sont désignés par les lettres A à G. Le produit primaire de la transcription est maturé au cours d'une série de «réactions d'excision-épissage», un peu comme un message enregistré sur bande peut être coupé et recollé. L'excision-épissage enlève les introns et réunit les régions codantes que l'on appelle des **exons**, pour former un ARNm qui, maintenant, est parfaitement colinéaire avec la molécule d'ovalbumine. Les exons sont indiqués par la lettre L et numérotés de 1 à 7 dans la figure 13-38. Dans d'autres gènes, des introns dont la longueur peut atteindre 2.000 paires de bases ont été détectés. Certains gènes contiennent jusqu'à 16 introns.

Il est clair que l'excision-épissage a lieu après la transcription et comporte plusieurs étapes puisque des transcrits d'ARN (appelés auparavant «ARN nucléaires hétérogènes» ou ARNHn) correspondant à la totalité du locus (introns + exons), ainsi que des transcrits de longueurs intermédiaires, peuvent être isolés. Dans ces ARN de longueurs intermédiaires, certains introns ont déjà été enlevés mais d'autres sont encore présents. La succession des opérations qui interviennent dans la maturation de l'ARN et l'excision-épissage est résumée dans la figure 13-39

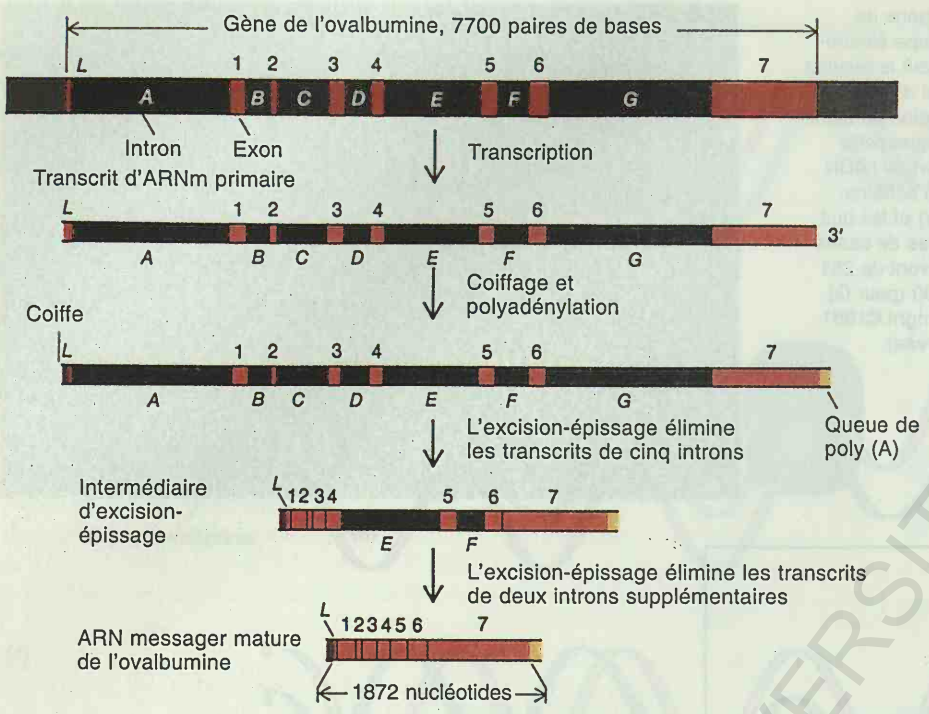


Figure 13-39. L'ARNm mature est produit en plusieurs étapes. (Extrait de P. Chambon, «Split genes.» Copyright ©1981 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés)

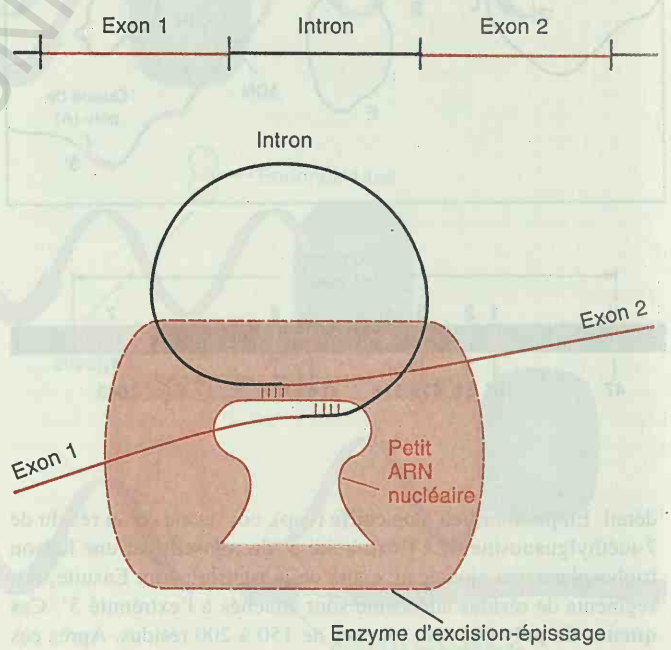


Figure 13-40. Diagramme décrivant l'éventuelle participation d'un petit ARN nucléaire à la réaction d'excision-épissage.

Le mécanisme d'excision-épissage des gènes

Il existe certaines similitudes de séquences aux jonctions exon-intron des ARNm. Par exemple, il y a un GU au site d'excision-épissage 5' et un AG au site 3' dans presque tous les ARNm examinés. On suppose que les enzymes d'excision-épissage reconnaissent une configuration commune aux ARNm et, avec l'aide de **petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires**, ou **snRNP**, catalysent les réactions de clivage et d'épissage. Il est possible que ces snRNP interviennent dans l'alignement des sites d'épissage en se liant par des liens hydrogène aux séquences situées aux limites des exons et des introns (figure 13-40). Un modèle couramment admis fait intervenir un intermédiaire en forme de lasso dans la réaction de maturation du transcrit primaire qui produit l'ARNm final. La figure 13-41 décrit ce **modèle du lasso.** Le site d'excision en 5' est d'abord clivé (a) au cours d'une réaction qui crée une boucle (b). Le groupement 3'OH nouvellement formé clive ensuite le site d'épissage en 3' (b), en libérant l'intron partiellement enroulé et en connectant les deux exons (c).

Dans les cellules d'eucaryotes supérieurs, les snRNP, le transcrit primaire (pré-ARNm) et des facteurs spplémentaires s'associent pour former un complexe de poids moléculaire élevé (60S) appelé un «*splicéosome*» (figure 13-42) qui catalyse les réactions de transestérification de l'épissage.

Auto-épissage de l'ARN

Un cas exceptionnel d'excision-épissage de l'ARN intervient chez *Tetrahymera*, où Thomas Cech et ses collaborateurs ont prouvé que la réaction de clivage est catalysée par la molécule d'ARN elle-même ! La figure 13-43 décrit cette réaction. Cette étonnante observation constitue la première démonstration de ce qu'une molécule d'ARN peut vraiment jouer le rôle d'une enzyme qui catalyse une réaction biologique spécifique. Les ARN doués d'activité enzymatique sont appelés des **ribozymes.**

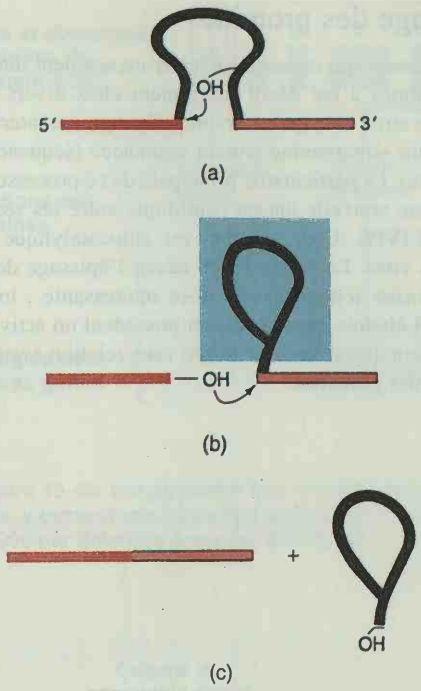


Figure 13-41. Structure en lasso ou boucle formée par une catégorie d'introns au cours de leur élimination des ARNm. (a) Un des nombreux groupements 2' hydroxyle de l'intron attaque le site d'excision en 5'. (b) La réaction suivante unit donc l'extrémité 5' de l'intron non pas à son extrémité 3' mais à un point situé à une courte distance de cette extrémité 3', en formant une structure branchée comportant une boucle ou lasso. (c) Le branchement est réalisé par la formation d'une nouvelle liaison 2'-5' phosphodiester qui permet à un nucléotide adénylique de former des liaisons phosphodiester avec trois autres nucléotides plutôt qu'avec deux comme d'habitude. La ligation des exons libère le lasso du reste de l'ARN. (Extraits de T. Cech «RNA as an Enzyme». Copyright ©1986 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

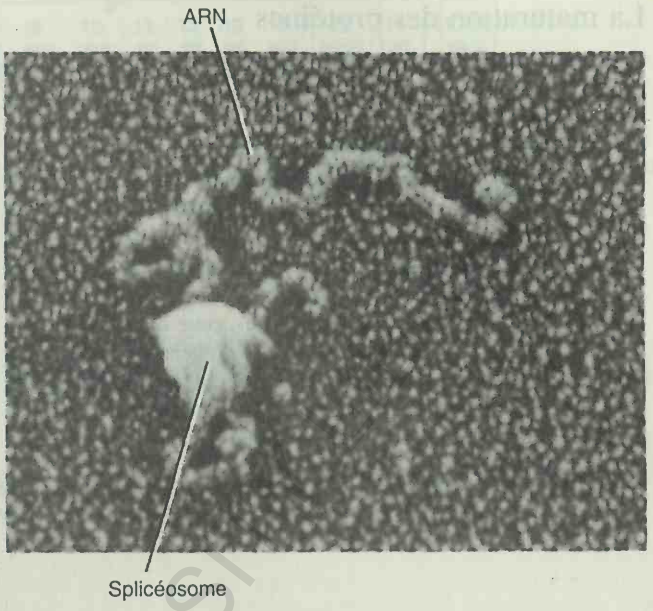


Figure 13-42. Photographie au microccscope électronique d'un spliceosome.(De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

Implications de l'existence des gènes mosaïques

La découverte que beaucoup de gènes eucaryotiques sont interrompus par des séquences d'ADN qui ne sont pas traduites en protéines s'oppose au concept du gène que nous avons développé à la fin du chapitre 12. Jusqu'à présent nous avions considéré un gène comme une séquence ininterrompue de nucléotides codant pour une macromolécule fonctionnelle (ARN ou protéine). Un gène et la protéine pour laquelle il code étaient colinéaires. Cette définition du gène doit évidemment être revue maintenant qu'elle ne s'applique plus à tous les cas. Chez les procaryotes et, dans une large mesure, chez les eucaryotes inférieurs, les gènes constituent une séquence codante continue. Dans le cas de nombreux gènes eucaryotiques, au contraire, des introns interrompent la séquence codante et le transcrit initial doit subir une maturation par des réactions d'excision-épissage pour fournir la molécule d'ARN terminée (ARNm, ARNt ou ARNr).

On ne connaît ni l'origine ni le rôle des introns. Dans certains cas, des mutations introduites dans les introns n'ont aucun effet décelable ; mais dans d'autres, l'élimination d'un seul intron suffit à interférer avec l'expression d'un gène. Walter Gilbert a suggéré que souvent les exons codent pour des domaines distincts des protéines et que le **brassage des exons** (exon shuffling) permet une évolution plus rapide. La figure 13-44 montre les 18 exons du gène du récepteur des LDL (lipoprotéines de faible densité) qui transportent le cholestérol dans les cellules. Voyez comme les régions fonctionnelles de la protéine sont groupées en domaines qui, à leur tour, sont codés par des groupes d'exons. Beaucoup de ces domaines consistent en des séquences répétées dont chaque exemplaire est codé par un exon. Les premier, quatrième, cinquième et sixième domaines forment un profile fonctionnel qu'on retrouve chez de nombreuses autres protéines membranaires. De plus, il existe une forte similitude de séquence entre le deuxième domaine et le *facteur de complément 9 (C9)*, une protéine sanguine. De la même manière, le troisième domaine présente une ressemblance étroite avec plusieurs autres protéines dont le facteur de croissance épidermique (EGF) et divers facteurs de coagulation sanguine. Ces similitudes de fonctions autant que de séquences suggèrent fortement que de nombreux gènes sont élaborés par l'assemblage d'exons provenant d'autres loci génétiques où ils se sont montrés efficaces dans l'accomplissement de certaines fonctions. Une grande diversité serait ainsi obtenue par le brassage d'un relativement petit nombre de séquences.

La maturation des protéines

Même après que la traduction d'un ARNm en protéine a été menée à bien, des étapes de maturation peuvent encore intervenir. Par exemple, ainsi que nous l'avons vu plus haut, les protéines membranaires ou celles qui sont excrétées par la cellule sont synthétisées avec, à leur extrémité amino-terminale (N-terminale), un court peptide «leader» appelé **séquence signal**. Il s'agit d'une séquence de 15 à 25 acides aminés dont la plupart sont hydrophobes. Cette séquence signal est reconnue par des facteurs et des récepteurs protéiques qui assurent le transport à travers la membrane cellulaire ; au cours de ce processus, cette séquence est clivée par une peptidase (figure 13-45). (Un phénomène analogue existe pour certaines protéines bactériennes qui sont sécrétées). De plus, divers petits peptides hormonaux, comme la corticotropine (ACTH) proviennent du clivage spécifique d'un seul long précurseur polypeptidique.

L'épissage des protéines

Un processus qui consiste à exciser un segment interne de certaines protéines a été décrit récemment chez divers organismes procaryotes aussi bien qu'eucaryotes. Ce segment interne est appelé **IVPS** pour «intervening protein sequence» (séquence protéique intervenante). La particularité principale de ce processus est la formation d'une nouvelle liaison peptidique entre les séquences qui flanquent l'IVPS. Cette réaction est autocatalytique et peut se dérouler in vitro. La figure 13-46 décrit l'épissage des protéines sous une forme schématique. Chose intéressante ; tous les segments IVPS étudiés jusqu'à présent possèdent un activité endonucléasique bien que cette activité soit sans relation avec la réaction d'épissage des protéines.

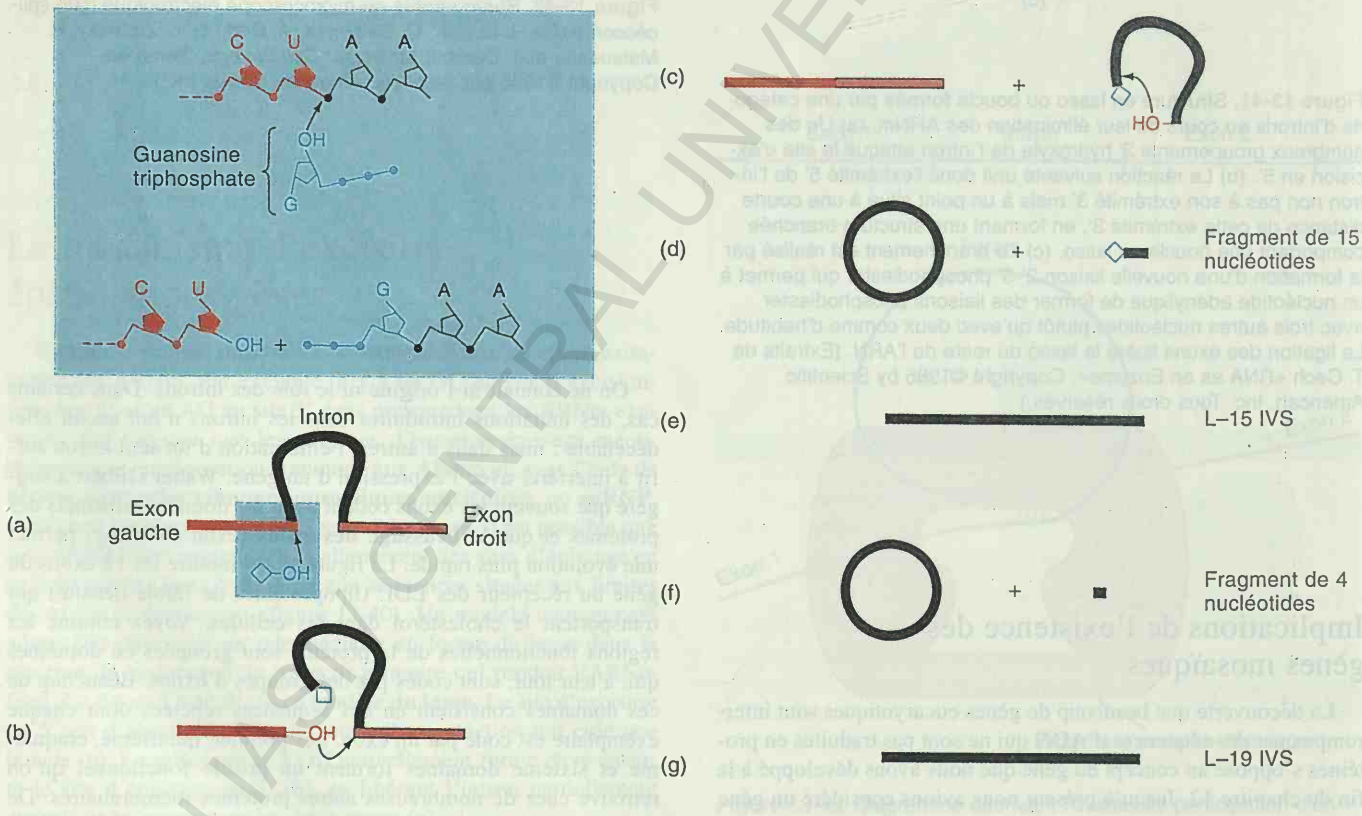


Figure 13-43. Un intron s'excise lui-même d'un précurseur d'ARNr de *Tetrahymena* sans l'aide d'aucune enzyme. La cascade des réactions qui mènent à l'élimination de l'intron est déclenchée par une molécule de guanosine ou de guanosine triphosphate libre (*représentée par un losange*). (a) Un groupement hydroxyle (OH) fixé au nucléotide «attaque» le phosphate qui se trouve à l'extrémité 5' de l'intron (*en médaillon*). La liaison phosphodiester entre l'intron et l'exon de gauche est rompue et une nouvelle liaison est formée entre la guanosine et l'intron. (b) Ceci libère un nouveau groupement hydroxyle à l'extrémité de l'exon gauche qui attaque l'extrémité 3' de l'intron. (c) Une liaison y est rompue et les exons sont raccordés, ou épissés, en libérant l'intron. (d) Une réaction similaire permet à l'intron de former un cercle, en coupant un fragment de 15 nucléotides à son extrémité. (e) Le cercle s'ouvre pour former une molécule linéaire et se referme en perdant quatre nucléotides (f). La structure finale relinéarisée (g) est appelée L-19 IVS (Séquence Intervenante Linéaire Moins 19). (Extrait de T. Cech, «RNA as an enzyme». Copyright ©1986 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

BCU IASH CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

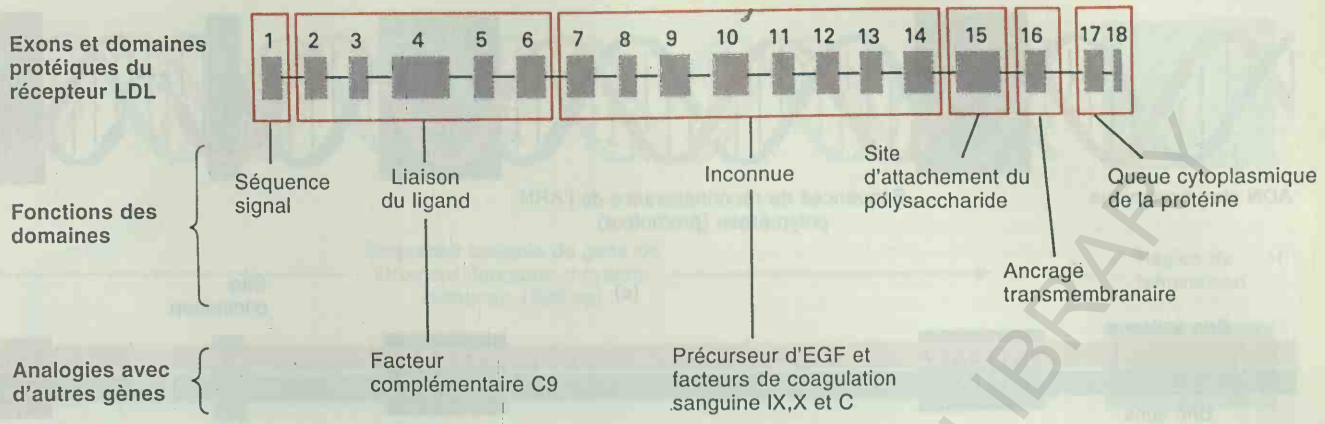


Figure 13-44. L'organisation des 18 exons constituant le gène de la protéine du récepteur LDL en six domaines fonctionnels, y compris une séquence signal. (De J. Darnell, H. Lodish et D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*, 2ième éd. Copyright ©1990 par Scientific American Books, Inc.)

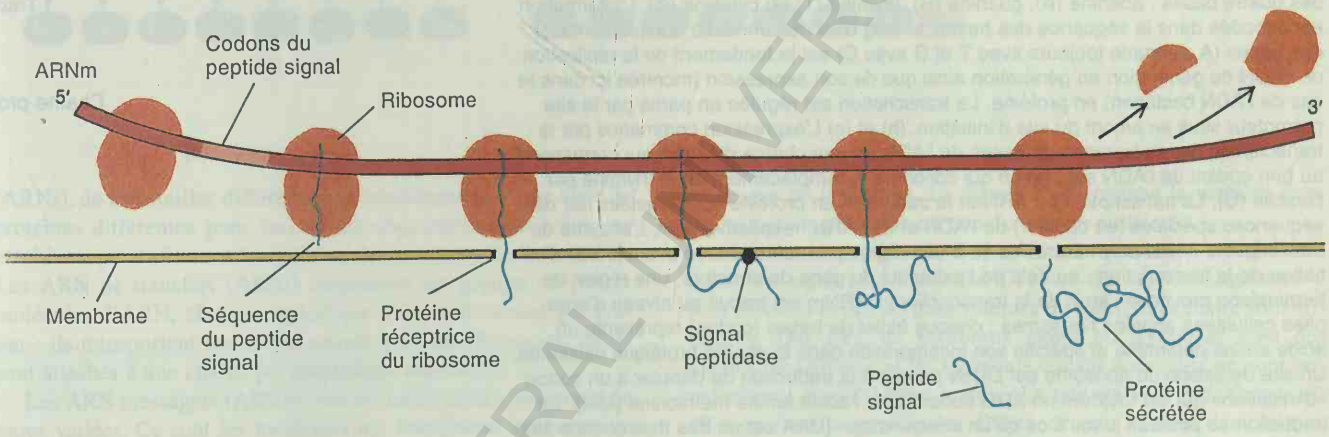


Figure 13-45. Séquence signal. Les protéines destinées à être sécrétées par la cellule possèdent une séquence amino-terminale riche en résidus hydrophobes. Cette «séquence signal» se lie à la membrane et entraîne le reste de la protéine à travers la bicouche lipidique. La séquence signal est séparée de la protéine au cours de ce processus par une enzyme appelée *peptidase signal*. (D'après J. D. Watson, J. Tooze et D. T. Kurtz, *Recombinant DNA : A Short Course*. Copyright ©1983 par W. H. Freeman and Company).

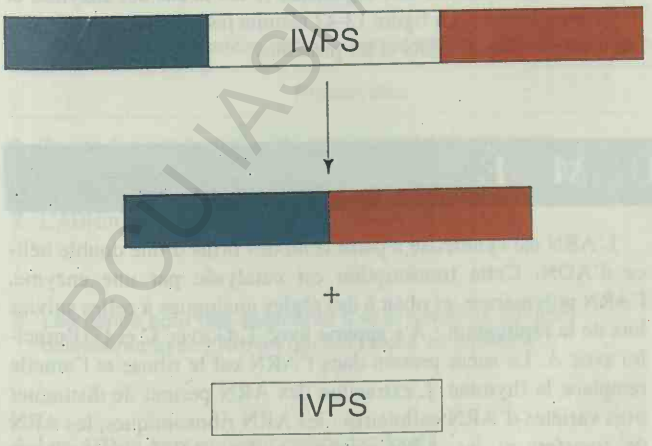


Figure 13-46. L'épissage des protéines consiste en l'excision d'un segment interne (IVPS) d'une protéine suivie de la formation d'une nouvelle liaison peptidique liant les régions qui flanquaient initialement l'IVPS.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

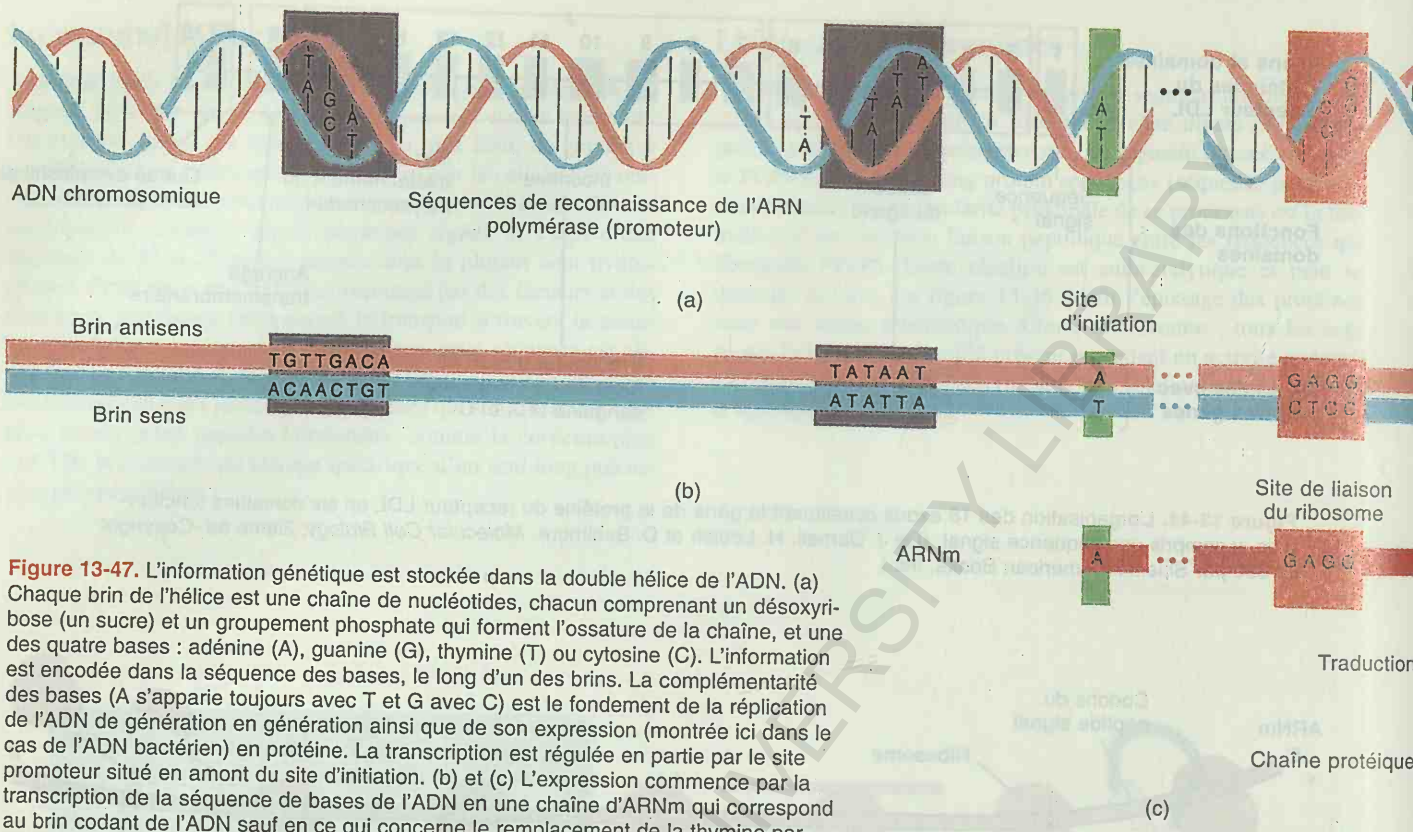


Figure 13-47. L'information génétique est stockée dans la double hélice de l'ADN. (a) Chaque brin de l'hélice est une chaîne de nucléotides, chacun comprenant un désoxyribose (un sucre) et un groupement phosphate qui forment l'ossature de la chaîne, et une des quatre bases : adénine (A), guanine (G), thymine (T) ou cytosine (C). L'information est encodée dans la séquence des bases, le long d'un des brins. La complémentarité des bases (A s'apparie toujours avec T et G avec C) est le fondement de la réplication de l'ADN de génération en génération ainsi que de son expression (montrée ici dans le cas de l'ADN bactérien) en protéine. La transcription est régulée en partie par le site promoteur situé en amont du site d'initiation. (b) et (c) L'expression commence par la transcription de la séquence de bases de l'ADN en une chaîne d'ARNm qui correspond au brin codant de l'ADN sauf en ce qui concerne le remplacement de la thymine par l'uracile (U). La transcription en ARN et la traduction en protéine sont régulées par des séquences spéciales (en couleur) de l'ADN et de l'ARN, respectivement. L'enzyme de transcription, l'ARN polymérase, se lie à une région promoteur située avant le site d'initiation de la transcription ; au delà de l'extrémité du gène de structure, une région de terminaison provoque l'arrêt de la transcription. L'ARNm est traduit au niveau d'organites cellulaires appelés ribosomes ; chaque triplet de bases (codon) représente un acide aminé déterminé et spécifie son incorporation dans la chaîne protéique naissante. Un site de liaison du ribosome sur l'ARN permet à la traduction de débuter à un codon «d'initiation» qui est toujours un AUG codant pour l'acide aminé méthionine (Met). La traduction se poursuit jusqu'à ce qu'un codon «stop» (UAA est un des trois codons stop possibles), qui annonce la fin de la traduction et le détachement de la chaîne protéique terminée du ribosome, soit atteint.

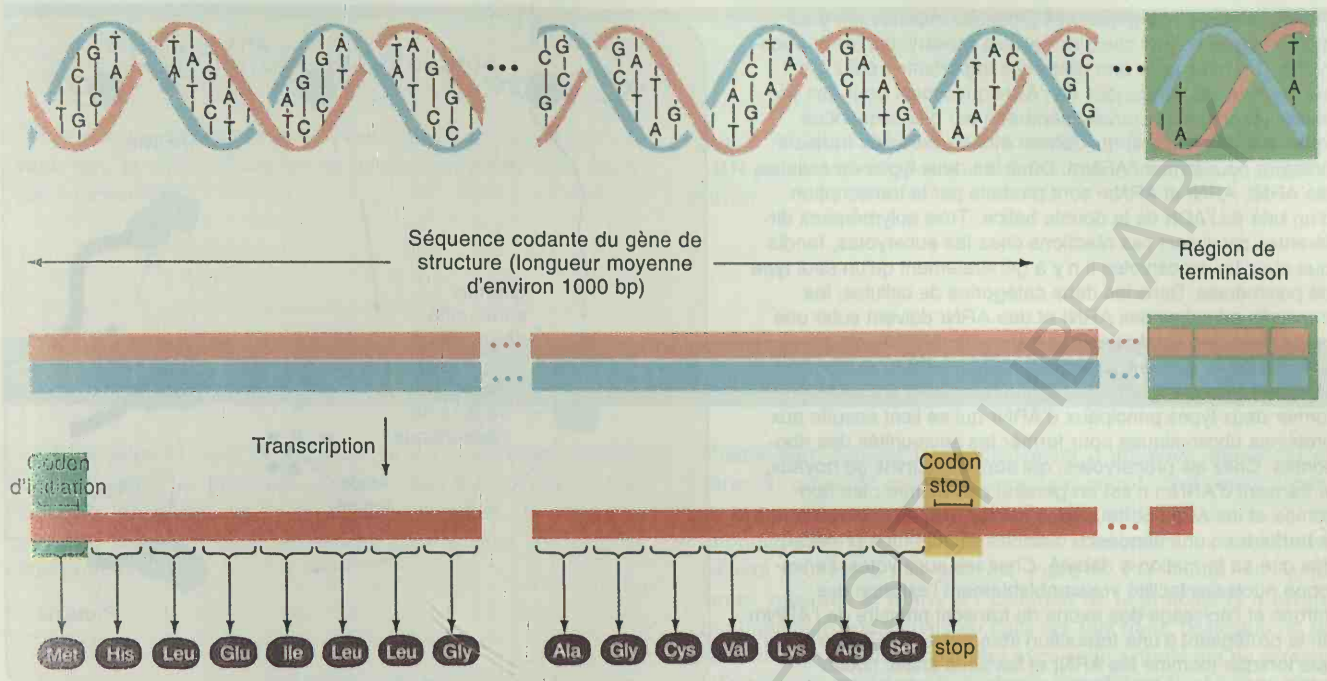
Revue

Ce chapitre ainsi que les chapitres 11 et 12 ont décrit l'élaboration de la théorie centrale de la génétique moléculaire. Une séquence linéaire de nucléotides de l'ADN est transcrite en une séquence linéaire d'ARN. Cette séquence d'ARN, qui chez les eucaryotes subit plusieurs étapes de maturation, sert ensuite de messager et est traduite par une machinerie de traduction complexe en la séquence d'acides aminés d'une protéine. La protéine ainsi synthétisée est soit une composante structurale de l'organisme (comme dans le cas des protéines des cheveux, des muscles ou de la peau), soit un élément régulateur de la chimie de l'organisme (c'est le cas des enzymes et de l'hémoglobine). La figure 13-47 résume les relations structurales qui existent entre l' ADN et les protéines.

RÉSUMÉ

Dans les chapitres précédents, nous avons appris que l'ADN est le matériel génétique qui commande la synthèse des protéines. La première indication de la manière dont l'ADN s'acquitte de cette tâche vint de l'étude des eucaryotes où on montra que l'ARN est synthétisé dans le noyau et ensuite transporté dans le cytoplasme. Néanmoins, la plupart des détails qui concernent ce transfert d'information de l'ADN aux protéines furent établis au cours d'expériences sur les bactéries et les phages.

L'ARN est synthétisé à partir d'un des brins d'une double hélice d'ADN. Cette transcription est catalysée par une enzyme, l'ARN polymérase, et obéit à des règles analogues à celles suivies lors de la réplication : A s'apparie avec T, G avec C et U (l'uracile) avec A. Le sucre présent dans l'ARN est le ribose et l'uracile remplace la thymine. L'extraction des ARN permet de distinguer trois variétés d'ARN cellulaires : les ARN ribosomiques, les ARN de transfert et les ARN messagers. Les ARN ribosomiques



(ARNr), de trois tailles différentes, se combinent avec une série de protéines différentes pour former les ribosomes, c'est-à-dire les machines qui réaliseront la synthèse des protéines (la traduction). Les ARN de transfert (ARNt) constituent un groupe de petites molécules d'ARN, chacune spécifique d'un acide aminé particulier : ils transportent les acides aminés vers les ribosomes, où ils sont attachés à une chaîne polypeptidique naissante.

Les ARN messagers (ARNm) ont des tailles et des séquences de bases variées. Ce sont les molécules qui fournissent l'information pour la structure des protéines. La séquence des codons d'un ARNm détermine la séquence des acides aminés d'un polypeptide. Chaque codon est spécifique d'un acide aminé, mais plusieurs codons peuvent coder pour ce même acide aminé ; en d'autres mots, le code génétique est redondant. De plus, il y a trois codons auxquels ne correspondent aucun ARNt ; ces codons «stop» provoquent l'arrêt du processus de traduction. La figure 13-47 résume la manière dont l'information génétique est transformée en protéines.

Chez les eucaryotes, l'ARN subit une maturation avant d'être transporté dans le cytoplasme. Des «coiffes» et des «queues» y sont ajoutées et des portions internes du transcrit primaire sont éliminées. Dès lors, de nombreux gènes eucaryotiques sont des «gènes mosaïques» et les segments codant d'un gène ne sont pas colinéaires avec l'ARNm mature. Le tableau 13-8 et la figure 13-48 rappellent les principales différences qui existent dans la synthèse des ARN chez les procaryotes et les eucaryotes.

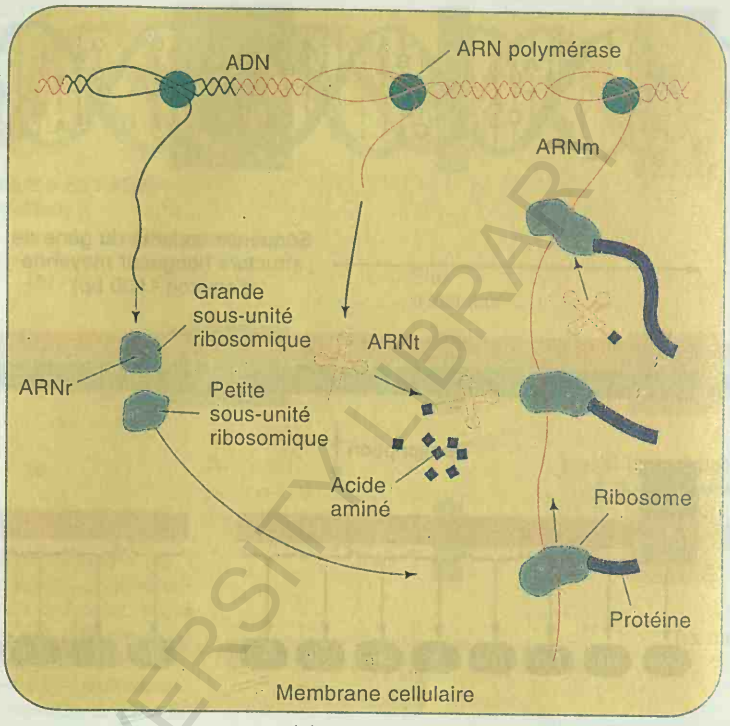
Les processus de stockage, de réplication, de transcription et de traduction de l'information sont fondamentalement similaires chez tous les êtres vivants. Par la démonstration de cette similarité, la génétique moléculaire a joué un rôle profondément unificateur en biologie.

Tableau 13-8. Différences dans l'expression des gènes chez les procaryotes et les eucaryotes

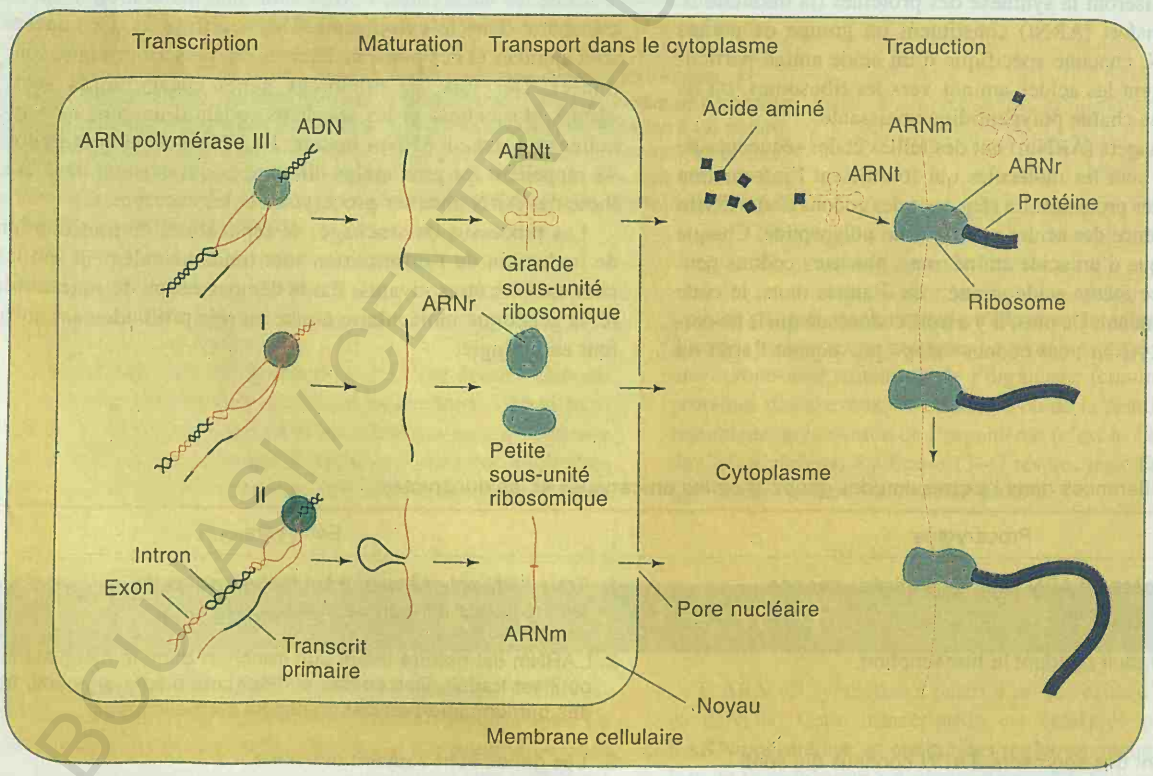
Procaryotes	Eucaryotes
1. Toutes les espèces d'ARN sont synthétisées par une seule ARN polymérase.	1. Trois ARN polymérases sont responsables de la synthèse des différentes classes d'ARN.
2. L'ARNm est traduit pendant la transcription.	2. L'ARNm est maturé avant son transport dans le cytoplasme, où il est traduit. Des coiffes et des queues sont ajoutées, et des portions internes des transcrits sont éliminées.
3. Les gènes sont des segments d'ADN continus qui sont colinéaires avec l'ARNm qui est traduit en protéine.	3. Les gènes sont souvent morcelés. Ils ne sont pas constitués de segments continus de séquences codantes ; au contraire, les séquences codantes sont interrompues par des séquences intervenantes (introns).
4. Les ARNm sont souvent polycistroniques.	4. Les ARNm sont monocistroniques.

BCU LAUSANNE / ICB LIBRARY

Figure 13-48. La synthèse des protéines implique les trois mêmes types d'ARN chez les cellules procaryotes (a) et eucaryotes (b), mais avec une différence importante : chez les eucaryotes, les séquences de l'ADN qui codent pour des protéines (exons) sont souvent séparées par des séquences intervenantes (introns) qui doivent être excisées du transcrit primaire pour former l'ARNm. Dans les deux types de cellules, les ARNt, ARNr et ARNm sont produits par la transcription d'un brin de l'ADN de la double hélice. Trois polymérases différentes catalysent ces réactions chez les eucaryotes, tandis que chez les procaryotes il n'y a généralement qu'un seul type de polymérase. Dans les deux catégories de cellules, les transcrits primaires des ARNt et des ARNr doivent subir une maturation. Les extrémités des transcrits d'ARNt sont clivées et la molécule acquiert une structure comportant des boucles. Un seul transcrit d'ARNr est clivé en plusieurs endroits pour former deux types principaux d'ARNr qui se lient ensuite aux protéines ribosomiques pour former les sous-unités des ribosomes. Chez les procaryotes, qui sont dépourvus de noyaux, le transcrit d'ARNm n'est en général pas maturé ; les ribosomes et les ARNt porteurs des acides aminés commencent à le traduire en une séquence d'acides aminés (une protéine) dès que sa formation a débuté. Chez les eucaryotes, l'enveloppe nucléaire facilite vraisemblablement l'excision des introns et l'épissage des exons du transcrit primaire de l'ARNm en le protégeant d'une traduction immédiate. L'ARNm n'est lu que lorsque (comme les ARNt et les sous-unités ribosomiques) il est sorti du noyau par les pores de l'enveloppe. Ce n'est que dans le cytoplasme qu'on trouve les ARNm matures, les ARNt et les ribosomes assemblés. (De J.E. Darnell, Jr. «RNA». Copyright ©1985 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés).



(a) Procaryote



(b) Eucaryote

BCU LAUSANNE / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Diagramme conceptuel

Dressez un diagramme conceptuel liant autant des termes suivants que possible. Notez qu'ils ne sont présentés dans aucun ordre particulier.

gène / ARNm / ARNt / transcription / excision / traduction / ARN polymérase / ribosome / codon / anticodon / acide aminé / intron

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Au chapitre 12 nous avons passé en revue différents aspects de la structure des protéines. Référez-vous à la figure 12-8 et expliquez les effets, sur l'activité d'une protéine, de mutations non-sens, faux sens et de déphasage dans le gène codant pour cette protéine.

Solution

Les mutations non-sens provoquent la terminaison de la synthèse des protéines. Un fragment seulement de la protéine est synthétisé. Comme on peut le voir dans la figure 12-8, des fragments de protéines ne seront pas capables d'adopter la configuration correcte pour former le site actif. C'est pourquoi ces fragments de protéines sont dépourvus d'activité. Les mutations faux-sens, d'autre part, causent le remplacement d'un acide aminé par un autre. Si cet acide aminé est important pour le repliement correct de la protéine ou s'il fait partie du site actif ou, encore, s'il est impliqué dans des interactions entre sous-unités, sa substitution mènera souvent à une protéine inactive. Par contre, si l'acide aminé substitué se trouve à l'extérieur de la protéine et n'est pas impliqué dans son activité ou dans ses fonctions, beaucoup de ses substitutions seront compatibles avec cette activité qui ne sera pas affectée. Les mutations de déphasage modifient la phase de lecture et provoquent l'incorporation d'acides aminés différents de ceux qui sont codés par la phase de lecture de type sauvage. A moins que la mutation de déphasage ne soit localisée à la fin de la protéine, la protéine altérée obtenue ne pourra pas se replier en prenant la configuration correcte et n'aura pas d'activité.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. En vous servant de la figure 13-18, montrez les conséquences pour la traduction de l'addition d'une adénine au début de la séquence codante suivante :

A
↓
-CGA-UCG-GAA-CCA-CGU-GAU -AAG -CAU-
- Arg - Ser - Glu - Pro - Arg - Asp - Lys - His -

Solution

En ajoutant un A au début de la séquence codante, la phase de lecture est déplacée et un jeu d'acides aminés différents est spécifié par la séquence, ainsi qu'on le montre ici (notez que des codons non-sens sont formés, ce qui résulte en la terminaison de la chaîne) :

-ACG-AUC-GGA-ACC-ACG-UGA-UAA-GCA-
- Thr - Ile - Gly - Thr - Thr - Stop - Stop -

2. L'addition d'un seul nucléotide suivie de la délétion d'un autre nucléotide 20 pb plus loin dans l'ADN entraîne un changement dans la séquence de la protéine de

- His - Thr - Glu - Asp - Trp - Leu - His - Gln - Asp -

en

- His - Asp - Arg - Gly - Leu - Ala - Thr - Ser - Asp -

Quel nucléotide a été introduit et lequel a été éliminé ? Quelle est la séquence originale de l'ARNm et quelle est sa nouvelle séquence ? (Suggestion : consultez la figure 13-18).

Solution

Nous pouvons écrire la séquence de l'ARNm de la protéine initiale (en tenant compte des ambiguïtés inhérentes à ce stade) :

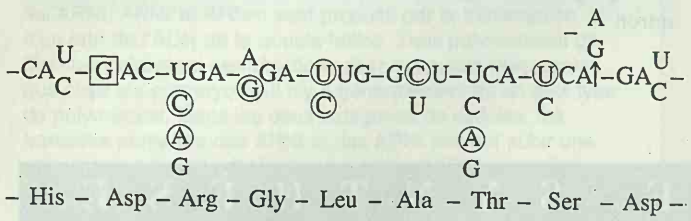
– His – Thr – Glu – Asp – Trp – Leu – His – Gln – Asp

$$-CA\begin{matrix}U\\C\end{matrix}-ACC\begin{matrix}U\\A\\G\end{matrix}-GA\begin{matrix}A\\G\end{matrix}-GA\begin{matrix}U\\C\end{matrix}-UGG-CUC\begin{matrix}U\\A\\G\\UUA\\G\end{matrix}-CA\begin{matrix}U\\C\end{matrix}-CA\begin{matrix}A\\G\end{matrix}-GA\begin{matrix}U\\C\end{matrix}$$

Puisque le changement de la séquence protéique qui nous est fourni dans l'énoncé du problème débute après le premier acide aminé

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(His) par l'addition d'un seul nucléotide, nous pouvons en déduire qu'un codon Thr doit être changé en un codon Asp. Cette modification doit consister en l'addition d'un G (entouré d'un carré) juste avant le codon Thr, ce qui change la phase de lecture de la manière suivante :



Dès lors, puisqu'une délétion d'un nucléotide doit restaurer le dernier codon Asp en rétablissant la phase de lecture correcte, un A ou un G doit avoir été perdu à la fin de l'avant-dernier codon (indiqué par une flèche). La séquence protéique de départ nous permet d'écrire la séquence de l'ARNm avec un certain nombre d'ambiguïtés à la première position et, dans un cas, à la troisième position des codons. Néanmoins, la séquence qui résulte du changement de phase nous permet d'identifier le nucléotide qui était présent dans l'ARNm de départ à l'endroit de la plupart de ces ambiguïtés. Les nucléotides qui devaient se trouver dans la séquence initiale sont indiqués par des cercles. L'ambiguïté ne subsiste que dans quelques cas.

PROBLÈMES

1. Les deux brins de l'ADN du phage λ diffèrent par leur contenu en GC. Grâce à cette propriété, ils peuvent être séparés dans un gradient de chlorure de césium alcalin (les conditions alcalines dénaturent la double hélice). Lorsque l'ARN synthétisé par le phage λ est isolé à partir des cellules infectées, on constate qu'il forme des hybrides avec les deux brins de l'ADN de λ. Qu'est-ce que ceci vous suggère ? Formulez des prévisions vérifiables expérimentalement.

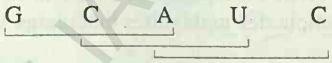
2. Les données du tableau 13-9 représentent les compositions en bases des ADN bicaténaires de deux bactéries ainsi que des ARN produits in vitro à partir de ces ADN.

a. Au départ de ces données, pouvez-vous déterminer si l'ARN de ces espèces est copié à partir d'un seul ou des deux brins de l'ADN ? Comment ? Il sera plus aisé de résoudre ce problème en dressant un diagramme.

b. Expliquez comment il vous est possible de dire si l'ARN lui-même est à un ou deux brins.

(Le problème 2 est reproduit avec la permission de Mac Millan Publishing Co., Inc., à partir de M. Strickberger, *Genetics*. Copyright ©1968, Monroe W. Strickberger).

3. Avant que la vraie nature du procédé de codage génétique ne fût parfaitement connue, on a envisagé la possibilité de l'existence d'un message comportant des triplets qui se chevauchent. Par exemple, la séquence GCAUC aurait pu être lue comme GCA CAU AUC :



Imaginez une vérification expérimentale de cette hypothèse.

4. Dans les systèmes de synthèse in vitro des protéines, l'addition d'un ARNm humain maturé spécifique à l'appareil de traduction d'*E. coli* (ribosomes, ARNt, etc.) entraîne la synthèse d'une protéine qui ressemble beaucoup à celle qui est spécifiée par cet ARNm. Qu'est-ce que ceci démontre ?

5. Quel anticodon prévoyez-vous pour un ARNt transportant l'isoleucine ? Y a-t-il plusieurs réponses ? Si c'est le cas, énoncez toutes les possibilités.

6. **a.** Combien de fois, dans le code génétique, seriez-vous dans l'impossibilté d'identifier l'acide aminé spécifié par un codon en ne connaissant que les deux premiers nucléotides de ce codon ?

b. Combien de fois seriez-vous dans l'impossibilité de déterminer les deux premiers nucléotides d'un codon en connaissant l'acide aminé qu'il spécifie ?

7. Indiquez quels auraient pu être les six codons de type sauvage dans les mutants qui conduisirent Brenner à déterminer la nature du codon ambre UAG.

8. Si un polyribonucléotide contient des quantités équivalentes d'adénine et d'uracile placées dans un ordre aléatoire, quelle est la proportion des triplets obtenus qui coderaient pour : a. La phénylalanine ? b. L'isoleucine ? c. La leucine ? d. La tyrosine ?

9. Vous avez synthétisé trois ARN messagers contenant des bases alignées au hasard en respectant les proportions : (**a**) 1U : 5C, (**b**) 1A : 1C : 4U, (**c**) 1A : 1C : 1G : 1U. Dans un système de synthèse in vitro des protéines, indiquez l'identité et les proportions des acides aminés qui seront incorporés dans les protéines lorsque chacun de ces ARNm sera testé. (Référez-vous à la figure 13-18).

Tableau 13-9.

	Rapport de bases de l'ADN	Rapports de bases des ARN	
Espèces	(A + T)/(G + C)	(A + U)/(G + C)	(A + G)/(U + C)
Bacillus subtilis	1,36	1,30	1,02
E. coli	1,00	0,98	0,80

BCU LAUSANNE CENTRALE UNIVERSITY LIBRARY

*10. Une des techniques utilisées pour déchiffrer le code génétique consistait à synthétiser des polypeptides in vitro en utilisant des ARNm synthétiques contenant la répétition de diverses séquences de bases — par exemple, $(AGA)_n$, qui pouvait être écrit AGAAGAAGAAGAAGA... Parfois, le polypeptide synthétisé ne contenait qu'un seul acide aminé (un homopolymère) mais parfois il en contenait plusieurs (un hétéropolymère), selon la séquence répétée utilisée. En outre, plusieurs polypeptides différents étaient parfois synthétisés à partir du même ARNm synthétique, ce qui suggérait que la synthèse des protéines dans un système in vitro ne débutait pas toujours au nucléotide terminal du messager. Par exemple, trois polypeptides peuvent être formés à partir d'$(AGA)_n$: l'homopolymère aa_1 (abréviation aa_1–aa_1), l'homopolymère aa_2 (abréviation aa_2–aa_2) et l'homopolymère aa_3 (abréviation aa_3–aa_3). Ils correspondent vraisemblablement aux lectures suivantes obtenues en partant de différentes positions dans la séquence :

AGA AGA AGA AGA ...
GAA GAA GAA GAA ...
AAG AAG AAG AAG ...

Le tableau 13-10 montre les résultats fournis par les expériences réalisées par Khorana.

a. Pourquoi $(GUA)_n$ et $(GAU)_n$ ne codent-ils chacun que pour deux homopolypeptides ?

Tableau 13-10.

ARNm synthétique	Polypeptide(s) synthétisé(s)
$(UC)_n$	(Ser-Leu)
$(UG)_n$	(Val-Cys)
$(AC)_n$	(Thr-His)
$(AG)_n$	(Arg-Glu)
$(UUC)_n$	(Ser-Ser) et (Leu-Leu) et (Phe-Phe)
$(UUG)_n$	(Leu-Leu) et (Val-Val) et (Cy-Cys)
$(AAG)_n$	(Arg-Arg) et (Lys-Lys) et (Glu -Glu)
$(CAA)_n$	(Thr-Thr) et (Asn-Asn) et (Gln-Gln)
$(UAC)_n$	(Thr-Thr) et (Leu-Leu) et (Tyr-Tyr)
$(AUC)_n$	(Ile-Ile) et (Ser-Ser) et (His-His)
$(GUA)_n$	(Ser-Ser) et (Val-Val)
$(GAU)_n$	(Asp-Asp) et (Met-Met)
$(UAUC)_n$	(Tyr-Leu-Ser-Ile)
$(UUAC)_n$	(Leu-Leu-Thr-Tyr)
$(GAUA)_n$	Néant
$(GUAA)_n$	Néant

NOTE : L'ordre dans lequel les polypeptides ou les acides aminés sont présentés est sans signification sauf pour $(UAUC)_n$ et $(UUAC)_n$.

b. Pourquoi $(GAUA)_n$ et $(GUAA)_n$ ne dirigent-ils aucune synthèse ?

c. Attribuez un acide aminé à chacun des triplets de la liste suivante. Souvenez-vous qu'il y a souvent plusieurs codons pour un seul acide aminé et que les deux premières lettres d'un codon sont habituellement les plus importantes (mais que la troisième lettre est parfois significative). Rappelez-vous également que parfois des codons qui paraissent très différents codent pour le même acide aminé. Essayez d'effectuer ce travail sans consulter la figure 13-18.

AUG	GAU	UUG	AAC
GUG	UUC	UUA	CAA
GUU	CUC	AUC	AGA
GUA	CUU	UAU	GAG
UGU	CUA	UAC	GAA
CAC	UCU	ACU	UAG
ACA	AGU	AAG	UGA

La solution de ce problème exige à la fois du raisonnement et des essais répétés. Ne perdez pas courage : Khorana reçut le prix Nobel pour y être arrivé. Bonne chance !

(Le problème 10 provient de J. Kuspira et G. W. Walker, *Genetics : Questions* and *Problems*, McGraw-Hill, 1973).

11. Vous étudiez un gène qui spécifie une protéine d'*E. coli*. Une partie de la séquence de la protéine est

-Ala-Pro-Trp-Ser-Glu-Lys-Cys-His-

Vous récoltez une série de mutants de ce gène qui ne montrent aucune activité enzymatique. En isolant les protéines des mutants, vous obtenez les séquences suivantes :

Mutant 1
-Ala -Pro-Trp-Arg-Glu-Lys-Cys-His-

Mutant 2
-Ala-Pro-

Mutant 3
-Ala-Pro-Gly-Val-Lys-Asn-Cys-His-

Mutant 4
-Ala-Pro-Trp-Phe-Phe-Thr-Cys-His-

Quel est la nature moléculaire de chaque mutation ? Quelle est la séquence d'ADN qui spécifie cette partie de la protéine ?

12. L'addition d'un seul nucléotide à un endroit et l'élimination d'un autre nucléotide environ 15 résidus plus loin dans l'ADN provoquent un changement de séquence de

-Lys-Ser-Pro-Ser-Leu-Asn-Ala-Ala-Lys-

en

-Lys-Val-His-His-Leu-Met-Ala-Ala-Lys-

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a. Quels sont les anciennes et les nouvelles séquences de nucléotides de l'ARNm ? (Utilisez la figure 13-18).

b. Quel nucléotide a été ajouté et lequel a été éliminé ?

(Le problème 12 provient de W. D. Stanfield, *Theory and Problems of Genetics*, MacGraw-Hill, 1969).

13. On connaît maintenant des supresseurs de mutations de déphasage. Proposez un mécanisme pour leur action.

14. Servez-vous de la figure 13-18 pour compléter le tableau suivant. Supposez que la lecture s'effectue de la gauche vers la droite et que les colonnes représentent les alignements de la transcription et de la traduction.

C											Double hélice de l'ADN
					T	G	A				
	C	A			U						ARNm synthétisé
								G	C	A	Anticodon de l'ARNt approprié
			Trp								Acides aminés incorporés dans la protéine

15. Un événement mutationnel insère un nucléotide supplémentaire dans l'ADN. Laquelle des conséquences suivantes prévoyez-vous ?

a. Pas de protéine du tout.

b. Une protéine dont un acide aminé est changé.

c. Une protéine dont trois acides aminés sont changés.

d. Une protéine dont deux acides aminés sont changés.

e. Une protéine dont la plupart des acides aminés qui suivent le site d'insertion sont changés.

16. Considérez un gène qui spécifie la structure d'une des chaînes de l'hémoglobine. Rangez les événements suivants dans leur ordre de déroulement le plus probable.

a. Une anémie est observée.

b. La forme du site de liaison de l'oxygène est altérée.

c. Un codon incorrect est introduit dans l'ARNm de ce gène de l'hémoglobine

d. L'ovule (gamète femelle) reçoit une dose élevée de radiation.

e. Un codon incorrect est formé dans l'ADN de ce gène de l'hémoglobine.

f. Une mère (technicienne radiologiste) se trouve accidentellement devant un générateur de rayons X en fonctionnement.

g. Un enfant meurt.

h. La capacité de transport de l'oxygène de l'organisme est sévèrement altérée.

i. L'anticodon d'ARNt qui s'apparie avec ce codon est d'un type qui introduit un acide aminé inadéquat.

j. Une substitution d'une paire de nucléotides a lieu dans l'ADN d'un des gènes de l'hémoglobine.

17. Un mutant cellulaire induit est isolé à partir d'une culture de tissu de Hamster sur la base de la résistance à l'α-amanitine (un poison extrait d'un champignon). Par électrophorèse, on montre que le mutant possède une ARN polymérase altérée ; une seule bande électrophorétique se trouve à une position différente de celle de la polymérase de type sauvage. Les cellules sont supposées être diploïdes. Que vous indique cette expérience quant à la manière de détecter des mutants récessifs parmi de telles cellules ?

18. Une molécule d'ADN bicaténaire possédant la séquence montrée au bas de la page produit in vivo un polypeptide de cinq acides aminés :

a. Quel brin est transcrit et dans quelle direction ?

b. Indiquez les extrémités 5' et 3' de chaque fibre.

c. Si une inversion se produit entre les deuxième et troisième triplets à partir, respectivement, des extrémités gauche et droite et si le même brin d'ADN est transcrit, quelle sera la longueur du polypeptide résultant ?

d. Supposez que la molécule initiale soit intacte et que la transcription s'effectue sur le brin inférieur, de la gauche vers la droite. Donnez la séquence de bases et indiquez les extrémités 5' et 3' de l'anticodon qui insère le *quatrième* acide aminé dans le polypeptide naissant. Quel est cet acide aminé ?

TAC ATG ATC ATT TCA CGG AAT TTC TAG CAT GTA
ATG TAC TAG TAA AGT GCC TTA AAG ATC GTA CAT

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

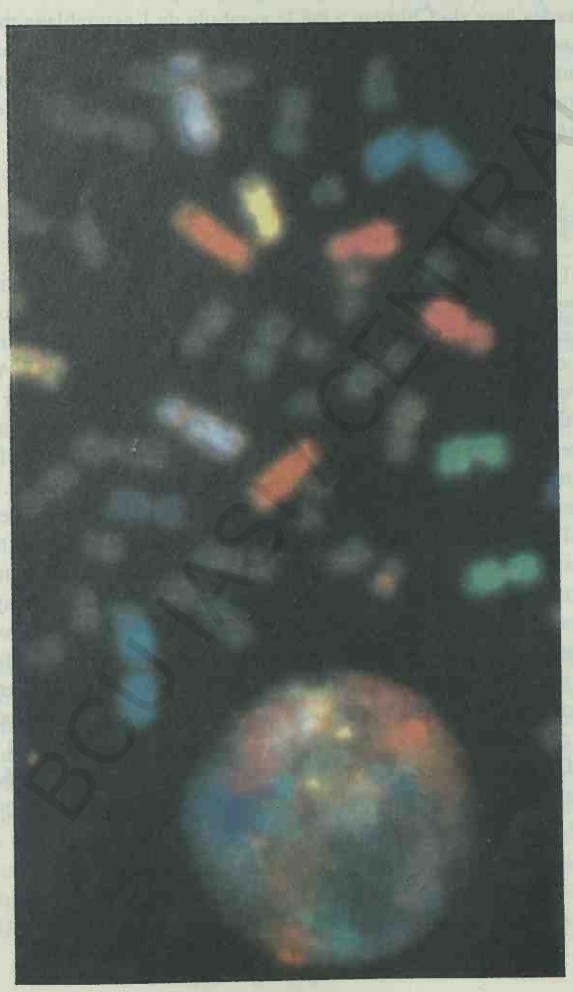
CHAPITRE

14

La technologie de l'ADN recombinant

CONCEPTS-CLÉS

- L'ADN recombinant est obtenu en insérant un fragment d'ADN «étranger» dans une petite molécule d'ADN capable de se répliquer de manière autonome : il devient alors possible d'amplifier et de produire un «clone» moléculaire du fragment inséré.



- Une collection de clones d'ADN qui couvre le génome tout entier constitue une banque génomique.
- Un clone d'ADN particulier peut être détecté dans une banque à l'aide d'une sonde spécifique de cet ADN ou de son produit protéique, ou encore par sa capacité à transformer un mutant nul (qui a perdu la fonction correspondante).
- Les enzymes de restriction coupent l'ADN à des sites spécifiques en produisant des fragments définis munis de bouts collants adéquats pour le clonage
- Les fragments d'ADN de tailles différentes obtenus par la digestion au moyen d'enzymes de restriction peuvent être séparés sur base de leurs migrations vers des positions différentes sur un gel d'électrophorèse.
- Les ADN et les ARN séparés sur base de la taille par électrophorèse sur gel peuvent être transférés sur une membrane poreuse ; celle-ci peut ensuite être examinée à l'aide de sondes permettant d'y détecter la position de fragments spécifiques.
- Les cibles des enzymes de restriction, une fois localisées, constituent des repères utiles pour la manipulation de l'ADN.
- Un gène peut être localisé en testant des clones chevauchants s'étendant vers l'extérieur à partir d'un marqueur lié.
- Un gène cloné peut être séquencé et utilisé pour déterminer sa fonction cellulaire.
- Disposant d'une paire d'amorces complémentaires des extrémités d'une courte séquence d'ADN, il est possible d'amplifier cette séquence et d'utiliser les nombreuses copies obtenues pour son étude.

Préparation de chromosomes dont plusieurs paires homologues ont été colorées au moyen de sondes fluorescentes spécifiques. Un noyau intact montre la position des chromosomes colorés dans le noyau. La photographie illustre les méthodes de localisation du matériel génétique basées sur les nouvelles technologies de l'ADN (Vysis).

BOSTON UNIVERSITY LIBRARY

Le but de la génétique est d'étudier la structure et la fonction des gènes et des génomes. Depuis l'époque de Mendel, les gènes ont été identifiés par la mesure de rapports phénotypiques standard au cours de croisements contrôlés. Les premières indications concernant la fonction des gènes découlèrent des corrélations qui purent être établies entre des mutations spécifiques et des déficiences touchant certaines enzymes ou d'autres protéines. La comparaison des localisations intragéniques de sites mutés avec les substitutions d'acides aminés des protéines correspondantes conduisit à une meilleure compréhension de la manière de fonctionner des gènes. Enfin, les découvertes liées à la nature de l'ADN et du code génétique firent progresser la connaissance de la structure de base et de la fonction des gènes. Mais ces déductions quant aux gènes étaient *indirectes* ; aucun gène n'avait jamais été isolé, ni sa séquence établie. Il semblait en effet impossible d'isoler un gène spécifique à partir du génome. S'il était relativement aisé d'extraire l'ADN d'un tissu vivant, une fois dans un tube à essai cet ADN ressemblait à un globule de mucus. Comment dès lors isoler un gène spécifique de cet enchevêtrement de filaments d'ADN ? La technologie de l'ADN recombinant a répondu à cette question et, aujourd'hui, l'isolement de gènes particuliers ou de toute autre portion d'un génome est une opération de routine. De plus, en utilisant cette même méthodologie, les généticiens peuvent obtenir la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN, la modifier à volonté et la réinsérer dans les cellules dont elle est issue — ou même d'un autre organisme. Ainsi, les généticiens ont la capacité de créer de nouveaux génotypes qui n'auraient jamais pu l'être par la génétique classique. Cette technologie a conduit non seulement à développer un mode d'analyse génétique plus sophistiqué et plus incisif mais aussi à concevoir de nombreuses applications dans les domaines de la médecine, de l'agriculture et de l'industrie.

La préparation de l'ADN recombinant

Comment fonctionne la technologie de l'ADN recombinant ? L'organisme étudié, qui fournira l'ADN qui sera analysé, est appelé l'**organisme donneur**. Fondamentalement, la méthode consiste à extraire et à couper l'ADN du génome du donneur pour obtenir des fragments contenant un ou plusieurs gènes. Ces fragments seront ensuite insérés séparément dans de petites molécules d'ADN circulaires (préalablement linéarisées) capables de se répliquer de façon autonome. Ces petites molécules jouent le rôle de transporteurs, ou de **vecteurs**, des fragments d'ADN. Les molécules de vecteurs avec leurs inserts constituent l'**ADN recombinant** puisqu'ils représentent des combinaisons nouvelles de l'ADN du donneur (qui peut provenir de n'importe quel organisme) avec l'ADN du vecteur provenant d'un tout autre organisme (en général un plasmide bactérien ou un virus). Le mélange d'ADN recombinant est ensuite utilisé pour transformer des cellules bactériennes dans des conditions qui favorisent la pénétration d'une seule molécule de vecteur recombinant par cellule réceptrice. Les cellules bactériennes sont étalées et se multiplient en formant des colonies. Une cellule transformée par un seul seul vecteur recombinant se divisera pour former une colonie qui comportera des millions de cellules qui toutes contiendront le même vecteur recombinant. Une colonie individuelle représente donc une population d'inserts d'ADN identiques ; cette population est appelée un **clone d'ADN.**

Message Un clonage consiste en l'amplification et la récolte d'un fragment d'ADN spécifique à partir d'un échantillon d'ADN important et complexe tel qu'un génome.

Puisque l'ADN du donneur a été partagé en de nombreux fragments différents, la plupart des colonies contiendront un insert cloné différent. Dès lors, l'étape suivante consistera à rechercher le clone qui correspond au gène auquel on s'intéresse. Une fois ce clone obtenu, l'ADN est isolé en grandes quantités et le gène recherché est excisé du vecteur ; une préparation purifiée et homogène est ainsi obtenue. Notez que la méthode convient parce que les molécules d'ADN recombinant individuelles pénètrent dans des cellules séparées de l'hôte bactérien qui se chargent de l'amplification des molécules isolées en produisant des populations importantes de molécules qui peuvent ensuite être traitées comme des réactifs chimiques. La figure 14-1 fournit un résumé de cette approche.

Il faut faire la distinction entre le terme d'*ADN recombinant* et les ADN recombinants naturels qui résultent de crossing-over entre des chromosomes homologues chez les eucaryotes et les procaryotes. L'ADN recombinant au sens où il est considéré dans ce chapitre est la combinaison artificielle des ADN de sources non homologues et le plus souvent d'organismes différents. Certains généticiens suggèrent un autre nom, celui d'**ADN chimérique**, une allusion au monstre de la mythologie grecque, la Chimère. A travers les âges, la Chimère a été le symbole de l'assemblage monstrueux de parties d'animaux différents. De même, l'ADN recombinant est une chimère d'ADN qui ne pourrait être construite sans la démarche expérimentale que nous appelons la *technologie de l'ADN recombinant*.

L'isolement de l'ADN

La première étape de la préparation de l'ADN recombinant est l'isolement des ADN du donneur et du vecteur. Des protocoles généraux pour l'isolement de l'ADN existaient déjà il y a plusieurs décennies avant le développement de la technologie de l'ADN recombinant. La majorité de l'ADN extrait du donneur par ces méthodes est de l'ADN génomique, c'est-à-dire précisément le type d'ADN que l'on désire analyser. La méthodologie utilisée pour obtenir l'ADN de vecteur dépend de la nature de celui-ci. Les plasmides bactériens sont des vecteurs communément utilisés et l'ADN génomique doit en être débarrassé. Un protocole d'extraction de l'ADN plasmidique par centrifugation est résumé dans la figure 14-2. L'ADN plasmidique forme une bande distincte après ultracentrifugation dans un gradient de densité en chlorure de césium contenant du bromure d'éthidium. La bande plasmidique est reccueillie en ménageant un trou dans le fond du tube à centrifuger. Une autre méthode repose sur l'observation qu'à un pH alcalin déterminé l'ADN génomique bactérien se dénature mais pas l'ADN plasmidique. Lors d'une neutralisation ultérieure l'ADN génomique précipite tandis que l'ADN plasmidique reste en solution.

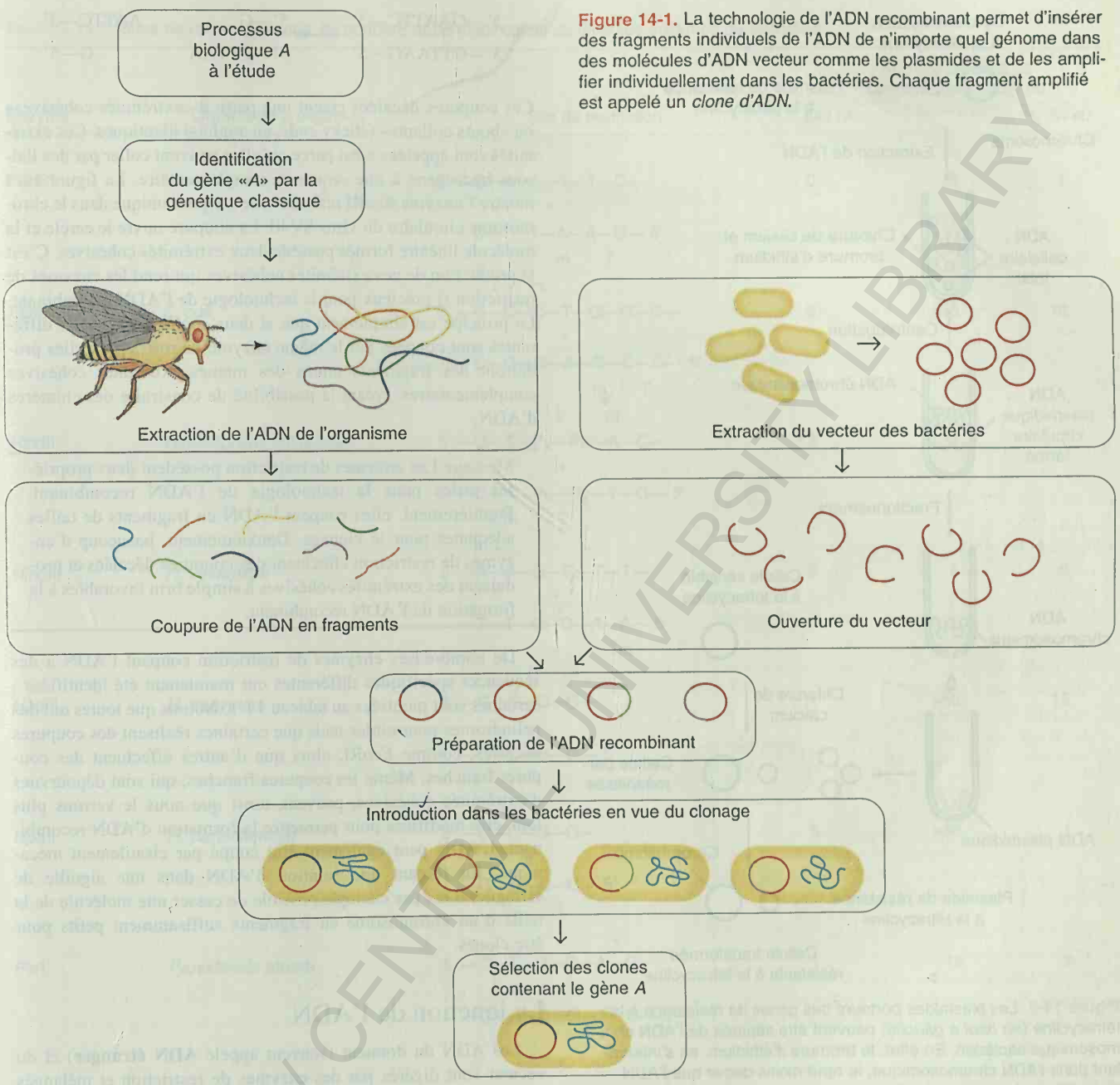


Figure 14-1. La technologie de l'ADN recombinant permet d'insérer des fragments individuels de l'ADN de n'importe quel génome dans des molécules d'ADN vecteur comme les plasmides et de les amplifier individuellement dans les bactéries. Chaque fragment amplifié est appelé un *clone d'ADN.*

La coupure de l'ADN

La percée essentielle qui rendit possible le développement de la technologie de l'ADN recombinant fut la découverte et la caractérisation des **enzymes de restriction.** Ces enzymes sont produites par des bactéries pour lesquelles elles constituent un mécanisme de protection vis-à-vis des phages. Elles jouent le rôle de ciseaux qui coupent l'ADN des phages et l'inactivent. Les enzymes de restriction ne coupent pas au hasard dans la séquence de l'ADN mais au niveau de séquences cibles spécifiques ; c'est une des particularités qui les rendent adéquates pour la manipulation de l'ADN. Toute molécule d'ADN, des virus à l'homme, contient par pur hasard des cibles pour les enzymes de restriction et peut donc être coupée en fragments définis de tailles adéquates pour le clonage. Les sites de restriction ne jouent aucun rôle dans les fonctions d'un organisme et ne sont pas coupés in vivo puisque la plupart des organismes ne possèdent pas d'enzymes de restriction . L'enzyme de restriction *Eco*RI (d'*E. coli*) reconnaît la séquence de six paires de nucléotides suivante qui est présente dans l'ADN de tous les organismes :

5'—GAATTC—3'
3'—CTTAAG—5'

IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

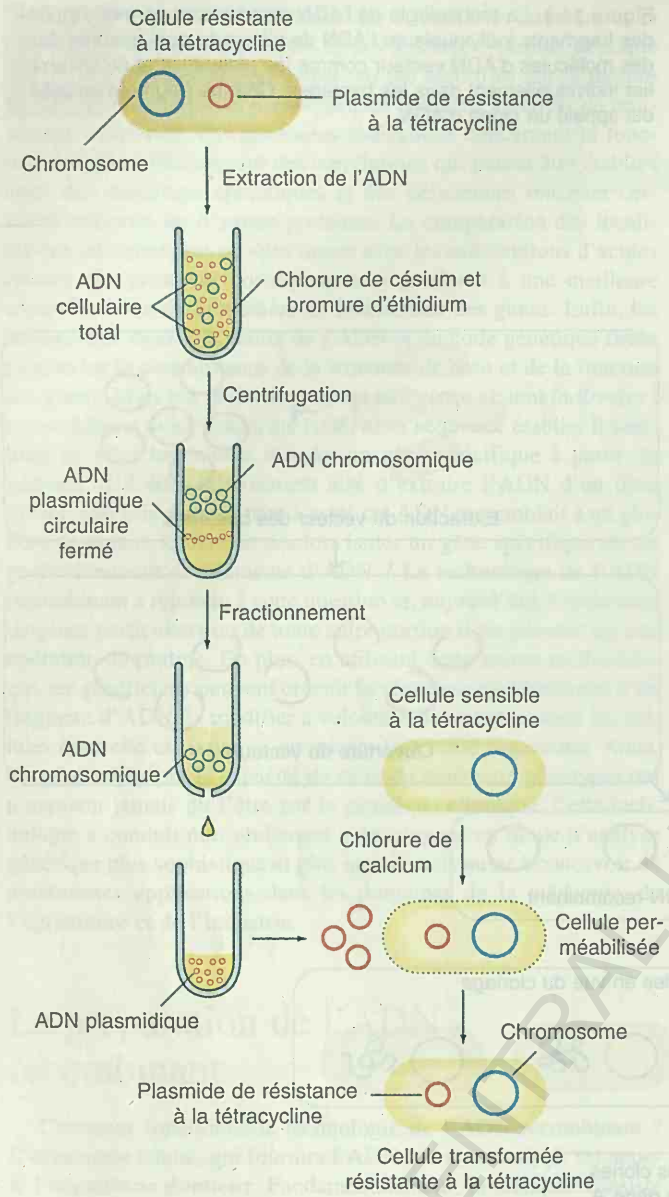


Figure 14-2. Les plasmides porteurs des gènes de résistance à la tétracycline (*en haut à gauche*) peuvent être séparés de l'ADN chromosomique bactérien. En effet, le bromure d'éthidium, en s'intercalant dans l'ADN chromosomique, le rend moins dense que l'ADN plasmidique. Les plasmides forment une bande distincte lors de la centrifugation en chlorure de césium et peuvent être séparés (*en bas à gauche*). Ils peuvent être introduits dans des cellules bactériennes par transformation (*à droite*). (Modifié d'après S. N. Cohen, «The Manipulation of Genes.» Copyright ©1975 by Scientific American, Inc. All right reserved.)

Ce type de segment est appelé un **palindrome**, ce qui signifie que les deux brins possèdent la même séquence mais en orientations antiparallèles. L'enzyme coupe l'ADN au niveau de cette séquence en ménageant des coupures décalées entre les nucléotides G et A.

5'—GAATTC—3' → 5'—G AATTC—3'
3'—CTTAAG—5' 3'—CTTAA G—5'

Ces coupures décalées créent une paire d'«extrémités cohésives» ou «bouts collants» (sticky ends, en anglais) identiques. Ces extrémités sont appelées ainsi parce qu'elles peuvent coller par des liaisons hydrogène à une séquence complémentaire. La figure 14-3 montre l'enzyme *Eco*RI réalisant une coupure unique dans le chromosome circulaire du virus SV40. La coupure ouvre le cercle et la molécule linéaire formée possède deux extrémités cohésives. C'est la production de ces extrémités cohésives qui rend les enzymes de restriction si précieux pour la technologie de l'ADN recombinant. Le principe est simplement que si deux molécules d'ADN différentes sont coupées par le même enzyme de restriction, elles produiront des fragments munis des mêmes extrémités cohésives complémentaires, créant la possibilité de construire des chimères d'ADN.

Message Les enzymes de restriction possèdent deux propriétés utiles pour la technologie de l'ADN recombinant. Premièrement, elles coupent l'ADN en fragments de tailles adéquates pour le clonage. Deuxièmement, beaucoup d'enzymes de restriction effectuent des coupures décalées et produisent des extrémités cohésives à simple brin favorables à la formation de l'ADN recombinant.

De nombreuses enzymes de restriction coupant l'ADN à des séquences spécifiques différentes ont maintenant été identifiées ; certaines sont montrées au tableau 14-1. Notons que toutes ont des palindromes pour cibles mais que certaines réalisent des coupures décalées, comme *Eco*RI, alors que d'autres effectuent des coupures franches. Même les coupures franches, qui sont dépourvues d'extrémités cohésives, peuvent, ainsi que nous le verrons plus loin, être modifiées pour permettre la formation d'ADN recombinant. L'ADN peut également être coupé par cisaillement mécanique. En forçant une solution d'ADN dans une aiguille de seringue, il est par exemple possible de casser une molécule de la taille d'un chromosome en fragments suffisamment petits pour être clonés.

La jonction de l'ADN

Les ADN du donneur (souvent appelé **ADN étranger**) et du vecteur sont digérés par des enzymes de restriction et mélangés dans un tube à essai afin de leur permettre de se joindre et de former de l'ADN recombinant. Il existe plusieurs manières de joindre l'ADN du donneur à celui du vecteur. Nous avons vu que beau-

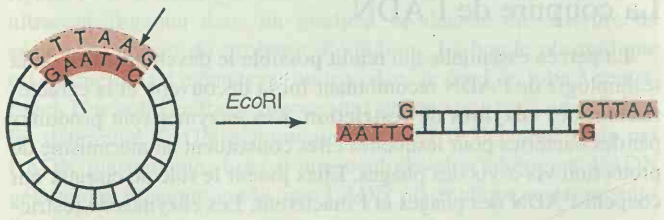


Figure 14-3. La coupure par l'enzyme de restriction *Eco*RI d'un ADN circulaire porteur d'une seule séquence cible pour cette enzyme, ainsi que la formation d'une molécule linéaire terminée par des bouts collants monocaténaires, sont montrées.

Tableau 14-1. Sites de reconnaissance, de coupure et de modification de diverses enzymes de restriction

Enzyme	Organisme d'origine	Site de restriction	Nombre de sites de coupure dans l'ADN de		
			ϕX174	λ	SV40
*Eco*RI	*Escherichia coli*	↓ m 5' —G—A—A—T—T—C— • —C—T—T—A—A—G— 5' m ↑	0	5	1
*Eco*RII	*E. coli*	↓ m 5' —G—C—C—T—G—G—C— • —C—G—G—A—C—C—G— 5' m ↑	2	>35	16
*Hin*dII	*Haemophilus influenzae*	↓ m 5' —G—T—Py—Pu—A—C— • —C—A—Pu—Py—T—G— 5' m ↑	13	34	7
*Hin*dIII	*H. influenzae*	m ↓ 5' —A—A—G—C—T—T— • —T—T—C—G—A—A— 5' ↑m	0	6	6
*Hae*III	*H. aegyptius*	↓ 5' —G—G—C—C— • —C—C—G—G— 5' ↑	11	>50	19
*Hpa*II	*H. parainflenzae*	↓ 5' —C—C—G—G— • —G—G—C—C— 5' ↑	5	>50	1
*Pst*I	*Providencia stuartii*	↓ 5' —C—T—G—C—A—G— • —G—A—C—G—T—C— 5' ↑	1	18	2
*Sma*I	*Serratia marcescens*	↓ 5' —C—C—C—G—G—G— • —G—G—G—C—C—C— 5' ↑	0	3	0
*Bam*I	*Bacillus amyloliquefaciens*	↓ 5' —G—G—A—T—C—C— • —C—C—T—A—G—G— 5' ↑	0	5	1
*Bgl*II	*B. globiggi*	↓ 5' —A—G—A—T—C—T— • —T—C—T—A—G—A— 5' ↑	0	5	0

Note : Il est d'usage d'indiquer la base méthylée par la présence d'un astérisque et non par un «m» comme nous l'avons fait ici pour éviter la confusion avec un marquage radioactif.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

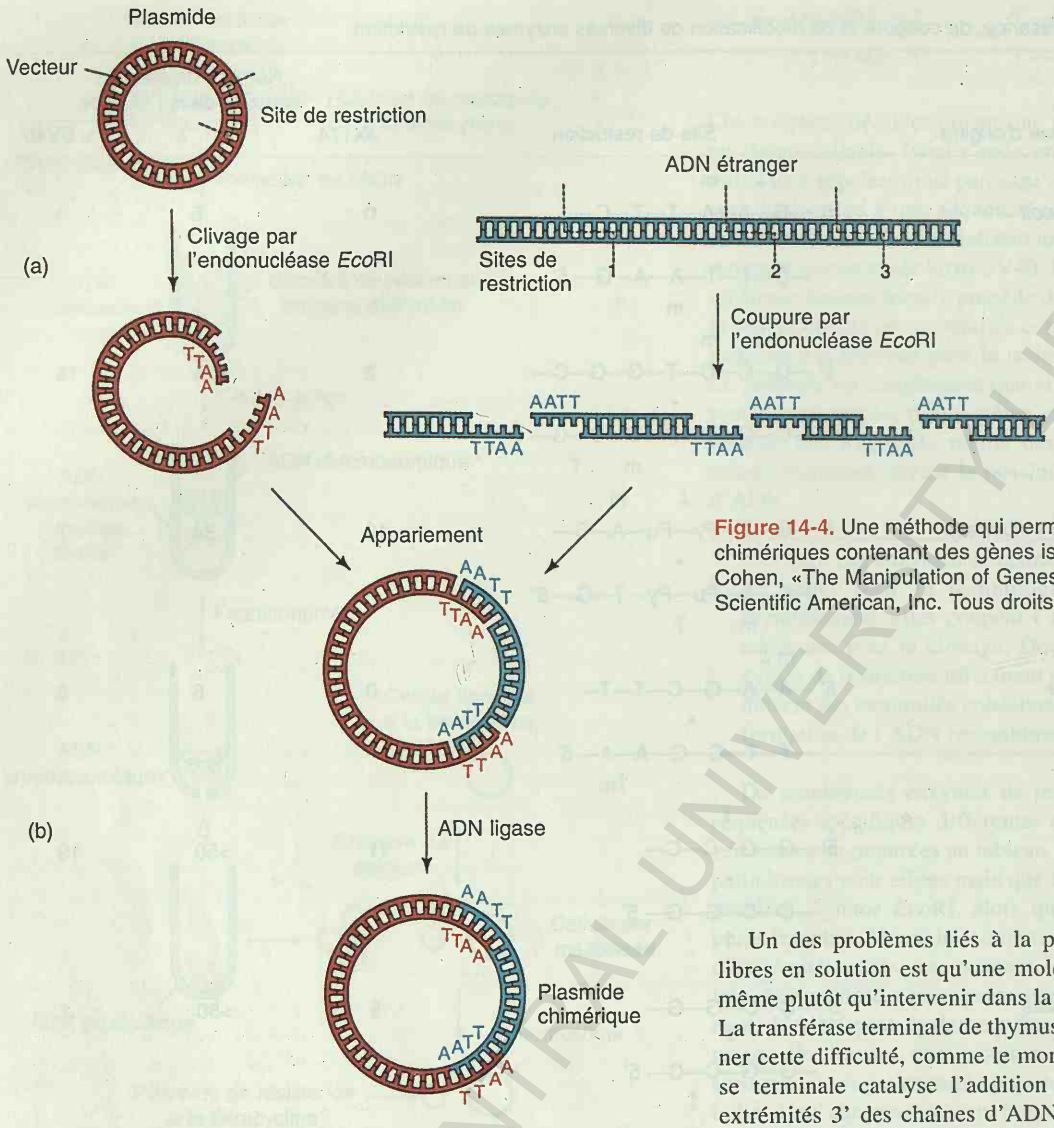


Figure 14-4. Une méthode qui permet de construire des plasmides chimériques contenant des gènes issus d'ADN différents. (De S. N. Cohen, «The Manipulation of Genes.» Copyright ©1975 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

coup d'enzymes de restriction coupent l'ADN au niveau d'une séquence spécifique et forment des extrémités cohésives à simple brin. Les brins de l'ADN du donneur s'apparient ensuite avec les extrémités cohésives du vecteur qui a été coupé par la même enzyme de restriction. Un exemple est montré dans la figure 14-4a. Dans cet exemple, le vecteur est un plasmide porteur d'un seul site *Eco*RI, de sorte que la digestion par cette enzyme convertit l'ADN circulaire en une molécule linéaire munie d'extrémités cohésives à simple brin. L'ADN provenant d'une source quelconque (de *Drosophila* , par exemple) peut être traité par l'enzyme *Eco*RI en produisant une population de fragments porteurs des mêmes extrémités cohésives. Lorsque les deux populations sont mélangées, les fragments des deux sources peuvent s'unir étant donné que des duplex se forment entre leurs extrémités cohésives. A ce stade, bien qu'une population de molécules chimériques existe, les squelettes sucre-phosphate sont encore incomplets à deux endroits pour chaque jonction. Néanmoins, les fragments peuvent être liés de manière permanente par l'action de l'ADN ligase, une enzyme qui crée des liaisons phosphodiester aux extrémités réunies et forment une molécule d'ADN continue (figure 14-4b).

Un des problèmes liés à la présence d'extrémités cohésives libres en solution est qu'une molécule peut se refermer sur elle-même plutôt qu'intervenir dans la formation d'ADN recombinant. La transférase terminale de thymus de veau offre le moyen de tourner cette difficulté, comme le montre la figure 14-5. La transférase terminale catalyse l'addition de queues nucléotidiques aux extrémités 3' des chaînes d'ADN. Ainsi, si on ajoute des molécules de dA (désoxyadénine) aux fragments d'ADN du vecteur et des molécules de dT aux fragments d'ADN du donneur, seules des chimères seront formées. Toutes les brèches monocaténaires formées (voir la figure) sont comblées par l'ADN polymérase I et les jonctions sont ensuite scellées par l'ADN ligase. Autre possibilité, des queues de poly(G) et de poly(C) peuvent être ajoutées aux extrémités 3' des fragments respectifs. Notons que, dans cette méthode, ce ne sont pas les extrémités formées par la restriction qui s'apparient mais les extrémités cohésives artificielles créées par les queues nucléotidiques. C'est pourquoi, dans ce cas, les extrémités formées par la restriction du donneur peuvent être différentes de celles du vecteur.

L'amplification de l'ADN recombinant

L'ADN du plasmide recombinant est introduit dans les cellules de l'hôte par transformation. Une fois dans la cellule hôte, le vecteur se répliquera de la manière habituelle mais maintenant que l'insert d'ADN du donneur en fait partie, il est automatiquement répliqué en même temps. Chaque plasmide recombinant qui pénètre dans une cellule y formera de multiples copies. Par la suite, de nombreux cycles de division cellulaire auront lieu et les vecteurs recombinants subiront d'autres cycles de réplication. La

BU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

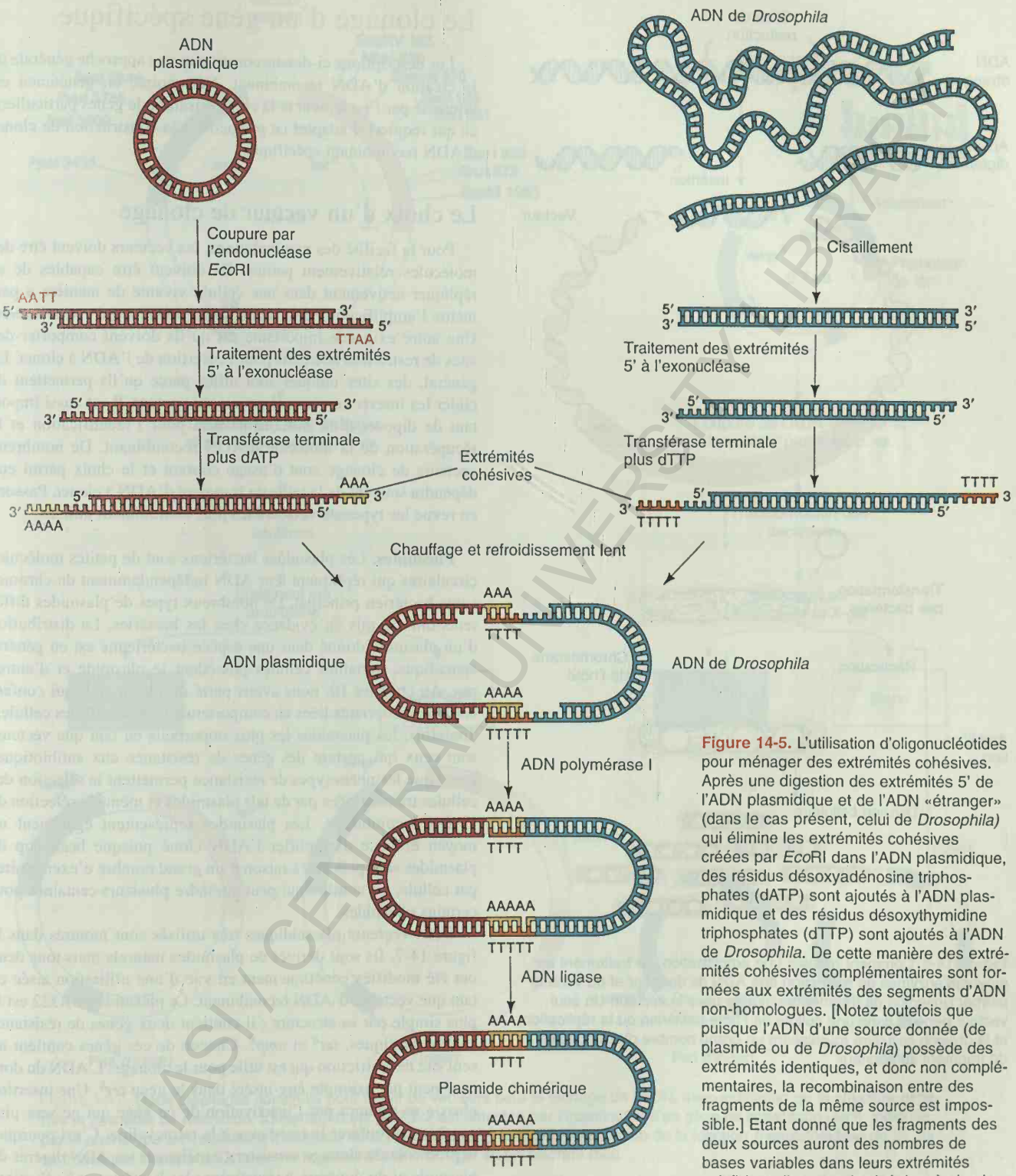


Figure 14-5. L'utilisation d'oligonucléotides pour ménager des extrémités cohésives. Après une digestion des extrémités 5' de l'ADN plasmidique et de l'ADN «étranger» (dans le cas présent, celui de *Drosophila)* qui élimine les extrémités cohésives créées par *Eco*RI dans l'ADN plasmidique, des résidus désoxyadénosine triphosphates (dATP) sont ajoutés à l'ADN plasmidique et des résidus désoxythymidine triphosphates (dTTP) sont ajoutés à l'ADN de *Drosophila*. De cette manière des extrémités cohésives complémentaires sont formées aux extrémités des segments d'ADN non-homologues. [Notez toutefois que puisque l'ADN d'une source donnée (de plasmide ou de *Drosophila*) possède des extrémités identiques, et donc non complémentaires, la recombinaison entre des fragments de la même source est impossible.] Etant donné que les fragments des deux sources auront des nombres de bases variables dans leurs extrémités cohésives, il y aura des brèches à simple brin dans les duplex formés. Celles-ci seront comblées à l'aide de l'ADN polymérase I et de l'ADN ligase pour donner des plasmides chimériques. (De S. N. Cohen, «The Manipulation of Genes» Copyright ©1975 by Scientific American, Inc. All rights reserved.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

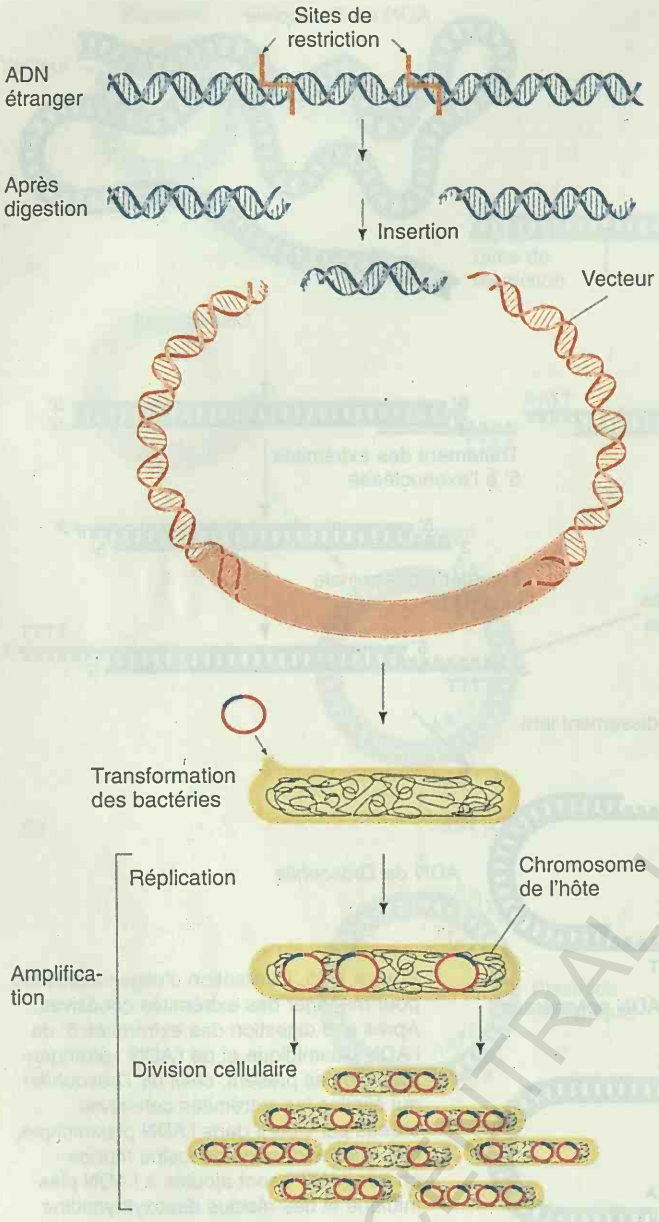


Figure 14-6. Comment réaliser une amplification. Le traitement au moyen d'enzymes de restriction des ADN du donneur et du vecteur permet l'insertion de fragments uniques dans le vecteur. Un seul vecteur pénètre dans une cellule de l'hôte bactérien où la réplication et la division cellulaire fournissent un grand nombre d'exemplaires du fragment du donneur.

colonie bactérienne qui se formera contiendra des milliards de copies de cet unique insert d'ADN du donneur. Cet ensemble de copies amplifiées du même insert constitue un clone d'ADN (figure 14-6).

Le clonage d'un gène spécifique

Les descriptions ci-dessus constituent une approche générale de la création d'ADN recombinant. Néanmoins, un généticien est intéressé par l'isolement et la caractérisation de gènes particuliers, ce qui requiert d'adapter ce protocole à la construction de clones d'ADN recombinant spécifiques.

Le choix d'un vecteur de clonage

Pour la facilité des manipulations, les vecteurs doivent être des molécules relativement petites. Ils doivent être capables de se répliquer activement dans une cellule vivante de manière à permettre l'amplification des fragments du donneur qui y sont insérés. Une autre exigence importante est qu'ils doivent comporter des sites de restriction adéquats pour l'insertion de l'ADN à cloner. En général, des sites uniques sont utiles parce qu'ils permettent de cibler les inserts vers un même site du vecteur. Il est aussi important de diposer d'un mécanisme aisé pour l'identification et la récupération de la molécule d'ADN recombinant. De nombreux vecteurs de clonage sont d'usage courant et le choix parmi eux dépendra souvent de la taille du fragment d'ADN à cloner. Passons en revue les types de vecteurs les plus couramment utilisés.

Plasmides. Les plasmides bactériens sont de petites molécules circulaires qui répliquent leur ADN indépendamment du chromosome bactérien principal. De nombreux types de plasmides différents ont été mis en évidence chez les bactéries. La distribution d'un plasmide donné dans une espèce bactérienne est en général sporadique, certaines cellules possèdant le plasmide et d'autres pas. Au chapitre 10, nous avons parlé du plasmide F qui confère certaines propriétés liées au comportement conjugatif des cellules. Toutefois, les plasmides les plus importants en tant que vecteurs sont ceux qui portent des gènes de résistance aux antibiotiques parce que les phénotypes de résistance permettent la sélection des cellules transformées par de tels plasmides et même la sélection de l'ADN recombinant. Les plasmides représentent également un moyen efficace d'amplifier l'ADN cloné puisque beaucoup de plasmides sont présents à raison d'un grand nombre d'exemplaires par cellule, un nombre qui peut atteindre plusieurs centaines pour certains plasmides.

Deux vecteurs plasmidiques très utilisés sont montrés dans la figure 14-7. Ils sont dérivés de plasmides naturels mais tous deux ont été modifiés génétiquement en vue d'une utilisation aisée en tant que vecteurs d'ADN recombinant. Le plasmide pBR322 est le plus simple par sa structure ; il contient deux gènes de résistance aux antibiotiques, tet^R et amp^R. Chacun de ces gènes contient un seul site de restriction qui est utile pour le clonage. L'ADN du donneur peut par exemple être inséré dans le gène tet^R. Une insertion réussie se traduira par l'inactivation de ce gène qui ne sera plus capable de conférer la résistance à la tetracycline. C'est pourquoi le protocole de clonage consistera à mélanger les ADN digérés du plasmide et du donneur, à transformer les bactéries et à sélectionner des colonies résistantes à l'ampicilline ; ces dernières doivent avoir été transformées avec succès par une molécule de plasmide. Parmi les colonies amp^R, seules celles qui s'avèrent sensibles à la tetracycline contiennent un insert ; en d'autres mots, seules les colonies amp^R tet^S contiennent de l'ADN recombinant. D'autres expériences sont nécessaires pour identifier les clones contenant l'insert spécifique recherché.

Le plasmide pUC est un vecteur plus élaboré dont la structure permet une sélection visuelle directe de colonies contenant des

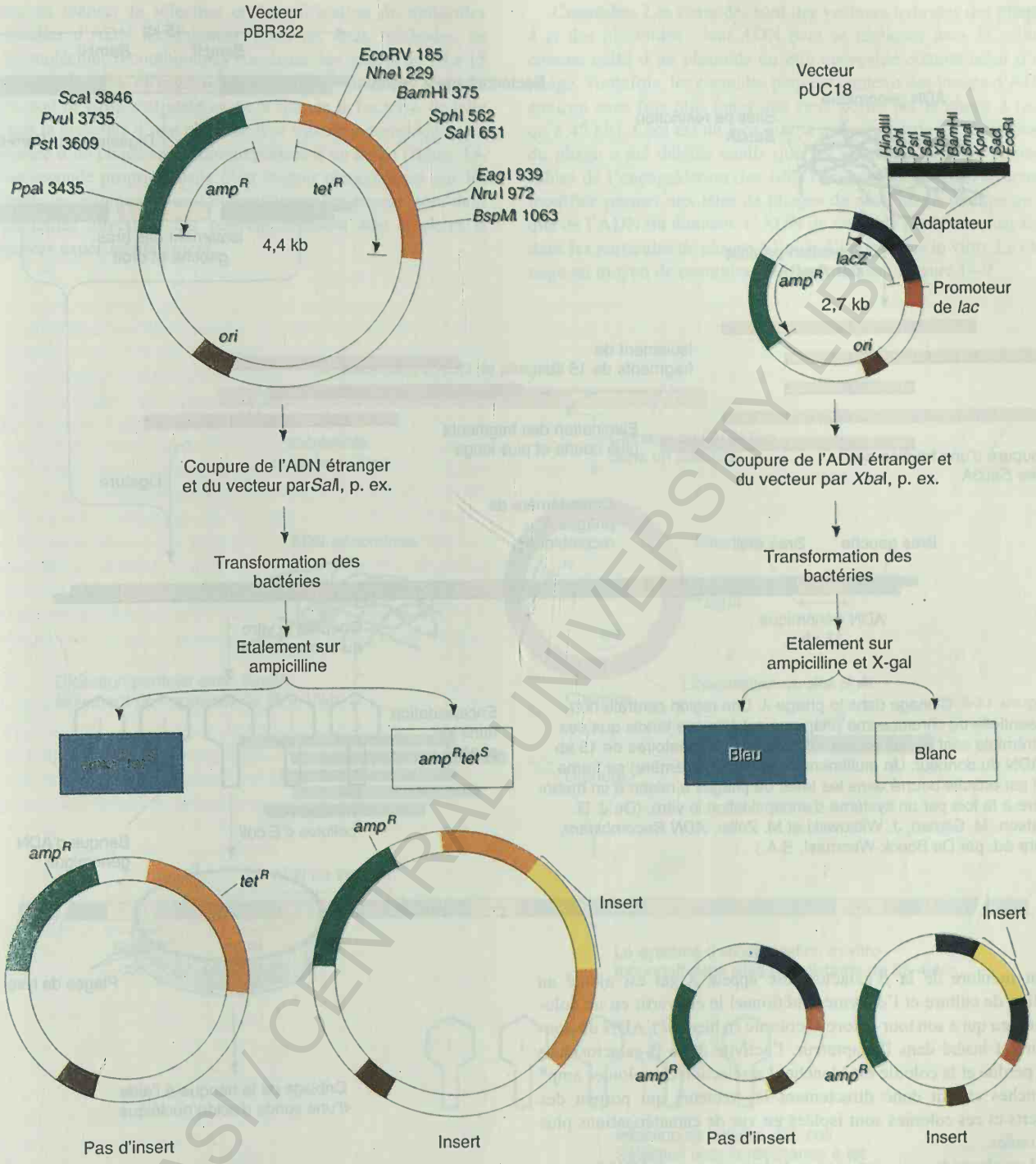


Figure 14-7. Deux plasmides construits pour servir de vecteurs pour le clonage de l'ADN, avec indication de la structure générale et des sites de restriction. L'insertion dans pBR322 est détectée par l'inactivation d'un gène de résistance (tet^R), indiquée par le phénotype tet^S (sensible). L'insertion dans pUC18 est détectée par l'inactivation de la fonction β-galactosidase de *Z'*, qui se traduit par l'incapacité à convertir le substrat artificiel X-gal en un colorant bleu.

vecteurs porteurs d'inserts d'ADN du donneur. L'élément-clé est une petite portion du gène de la β-galactosidase d'*E. coli*.. Un segment d'ADN appelé un **adaptateur** (en anglais, polylinker ou multiple cloning site) qui contient de nombreux sites de restriction utiles pour l'insertion de fragments de l'ADN du donneur a été inséré dans cette région. L'adaptateur est en phase avec la séquence codante de la β-galactosidase et n'interfère pas avec son fonctionnement. Le protocole de transformation utilise des cellules réceptrices qui contiennent un gène de la β-galactosidase dépourvu du fragment présent sur le plasmide. Une forme de complémentation inhabituelle a lieu dans laquelle les deux fragments s'unissent pour former une β-galactosidase fonctionnelle. Un sub-

BCU - ASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

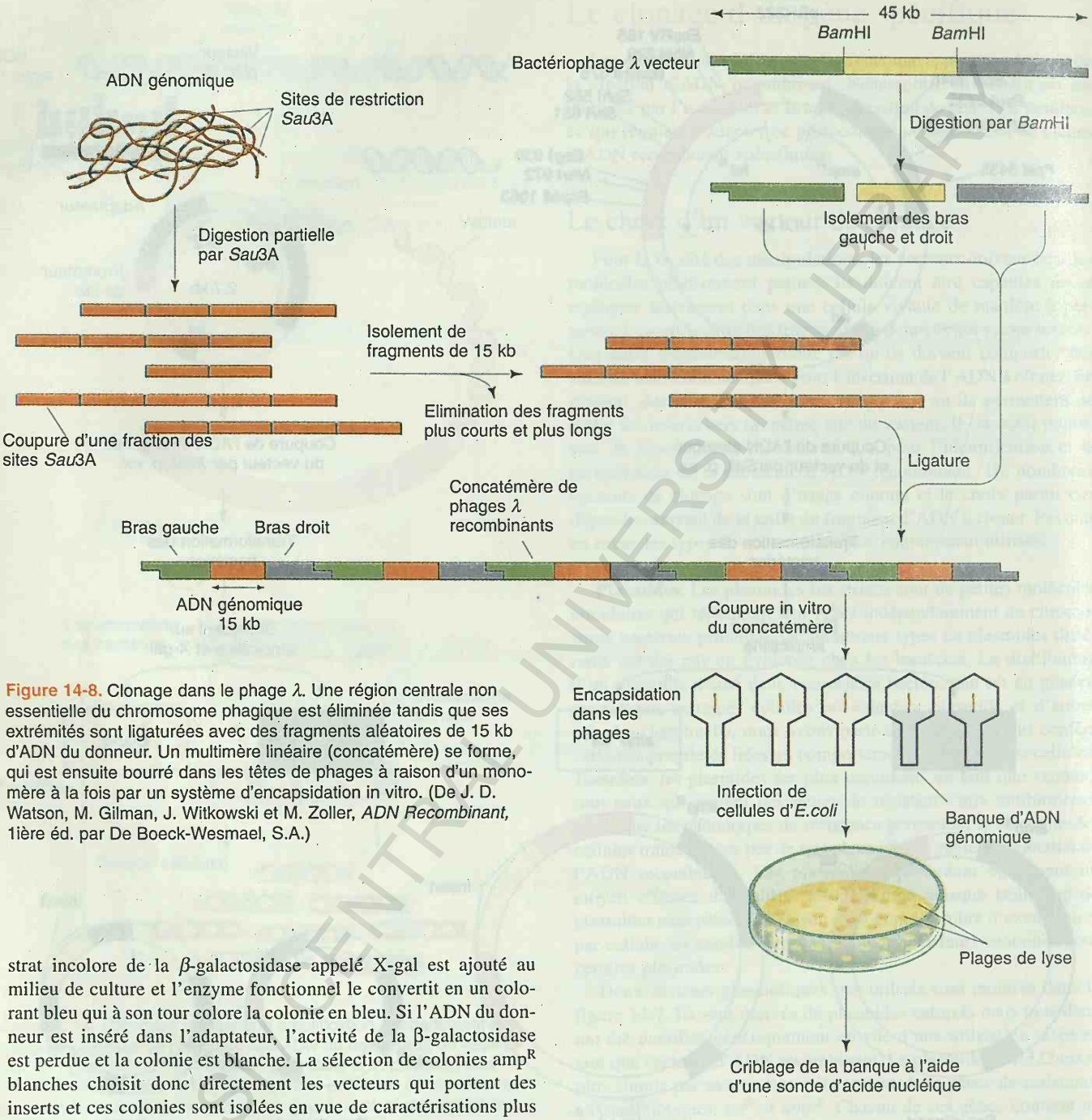


Figure 14-8. Clonage dans le phage λ. Une région centrale non essentielle du chromosome phagique est éliminée tandis que ses extrémités sont ligaturées avec des fragments aléatoires de 15 kb d'ADN du donneur. Un multimère linéaire (concatémère) se forme, qui est ensuite bourré dans les têtes de phages à raison d'un monomère à la fois par un système d'encapsidation in vitro. (De J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *ADN Recombinant,* 1ière éd. par De Boeck-Wesmael, S.A.)

strat incolore de la β-galactosidase appelé X-gal est ajouté au milieu de culture et l'enzyme fonctionnel le convertit en un colorant bleu qui à son tour colore la colonie en bleu. Si l'ADN du donneur est inséré dans l'adaptateur, l'activité de la β-galactosidase est perdue et la colonie est blanche. La sélection de colonies amp^R blanches choisit donc directement les vecteurs qui portent des inserts et ces colonies sont isolées en vue de caractérisations plus poussées.

Les plasmides qui contiennent de longs inserts d'ADN étranger ont tendance à perdre spontanément ces inserts ; c'est pourquoi les plsmides ne conviennent pas pour cloner des fragments d'ADN de plus de 20 kb. (La longueur de l'ADN est habituellement exprimée en kilobases, abréviation kb. Au sens strict, ceci est un emploi incorrect du mot base, puisque l'ADN est en réalité constitué de paires de nucléotides et que 1 kb signifie en réalité«1000 paires de nucléotides».)

Le phage λ. Le phage λ est un vecteur de clonage efficace pour plusieurs raisons.Tout d'abord, la tête d'un phage λ peut encapsider spécifiquement un chromosome d'environ 50 kb et, comme on le verra, cette propriété permet de sélectionner des molécules de λ contenant des inserts d'ADN étranger. La région centrale du génome de phage n'est pas nécessaire pour la réplication ou l'encapsidation des molécules d'ADN de λ dans *E. coli* et peut donc être excisée au moyen d'enzymes de restriction et écartée. Les deux «bras» restants sont ligaturés avec de l'ADN du donneur digéré par des enzymes de restriction. Les molécules chimériques obtenues peuvent être introduites dans *E. coli* par un type spécial de transformation appelé *transfection* ou encapsidées in vitro dans les têtes de phage. Dans ce système, l'ADN et les composants de la tête de phage sont mélangés et des particules infectives de phage se forment spontanément. L'encapsidation in vitro est une autre

manière de réaliser la sélection et l'amplification de molécules individuelles d'ADN recombinant. Dans les deux méthodes, ce sont les molécules recombinantes contenant des inserts de 10 à 15 kb qui sont le plus efficacement encapsidées dans les têtes de phages, soit in vitro, soit juste avant la lyse de la bactérie, de telle sorte que la présence d'une plage de lyse signale automatiquement la présence d'un phage recombinant porteur d'un insert (figure 14-8). Une seconde propriété utile d'un vecteur phagique est que les molécules recombinantes sont automatiquement encapsidées dans des particules infectives qui peuvent aisément être stockées et manipulées expérimentalement.

Cosmides. Les cosmides sont des vecteurs hybrides des phages λ et des plasmides ; leur ADN peut se répliquer dans la cellule comme celui d'un plasmide ou être encapsidé comme celui d'un phage. Toutefois, les cosmides peuvent contenir des inserts d'ADN environ trois fois plus longs que ceux portés par le phage λ (jusqu'à 45 kb). Ceci est dû à ce que la majeure partie de la structure du phage a été délétée tandis que les séquences signaux responsables de l'encapsidation (les sites *cos*) subsistent. Cette structure modifiée permet aux têtes de phages de ne contenir pratiquement que de l'ADN du donneur. L'ADN de cosmide peut être encapsidé dans les particules de phages à l'aide d'un système in vitro. Le clonage au moyen de cosmides est illustré dans la figure 14-9.

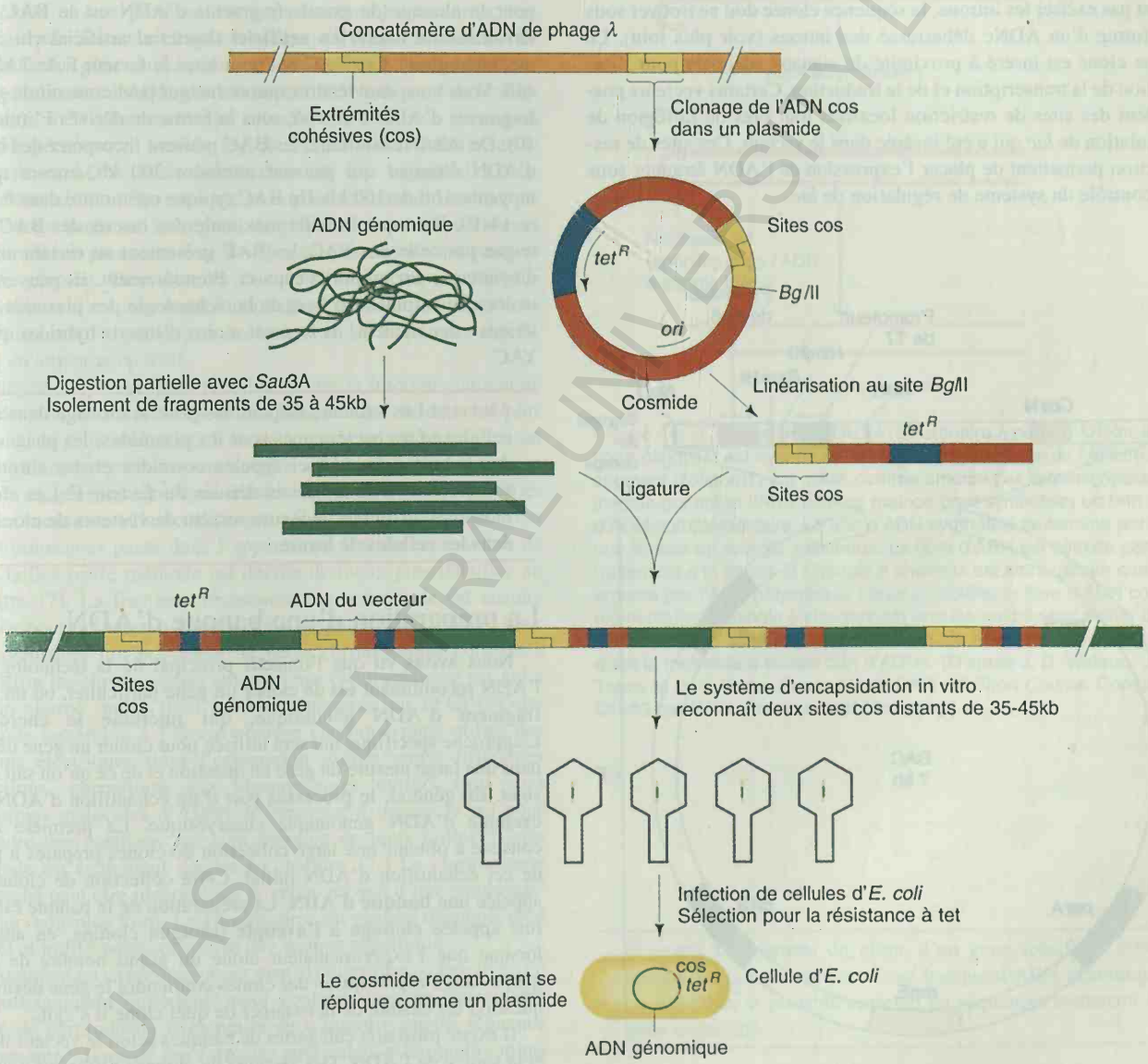


Figure 14-9. Le clonage à l'aide de cosmides. Le cosmide est coupé à un site *Bg*/I proche du site cos. L'ADN génomique du donneur est coupé à l'aide de *Sau*3A qui fournit des extrémités cohésives compatibles avec *Bg*/I. Un série de répétitions en tandem de l'ADN du donneur et du vecteur résulte du mélange. Le phage est encapsidé in vitro en coupant au site cos. Le cosmide avec son insert se recircularise dans la cellule bactérienne. (De J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *ADN Recombinant*, 1ière éd. par De Boeck-Wesmael, S.A.)

KU LEUVEN / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Phages à simple brin. Certains phages ne contiennent que des molécules d'ADN à simple brin. Lors de l'infection d'une bactérie, le simple brin infectant est converti en une forme réplicative à double brin qui peut être isolée et utilisée pour le clonage. L'avantage de ces phages en tant que vecteurs de clonage provient de ce que l'ADN à simple brin est précisément le substrat nécessaire pour la technique de séquençage aux didésoxynucléotides de Sanger qui est couramment utilisée à l'heure actuelle (page 446). Le phage M13 est celui dont l'usage est le plus répandu dans ce but.

Vecteurs d'expression. Les vecteurs d'expression sont des vecteurs où le gène cloné peut être transcrit et traduit en protéine. De cette manière, une protéine étrangère peut être synthétisée dans une cellule bactérienne. Toutefois, puisque les bactéries ne peuvent pas exciser les introns, la séquence clonée doit se trouver sous la forme d'un ADNc débarrassé des introns (voir plus loin). Le gène cloné est inséré à proximité de signaux adéquats pour l'initiation de la transcription et de la traduction. Certains vecteurs possèdent des sites de restriction localisés tout près de la région de régulation de *lac* qui a été insérée dans le vecteur. Ces sites de restriction permettent de placer l'expression de l'ADN étranger sous le contrôle du système de régulation de *lac*.

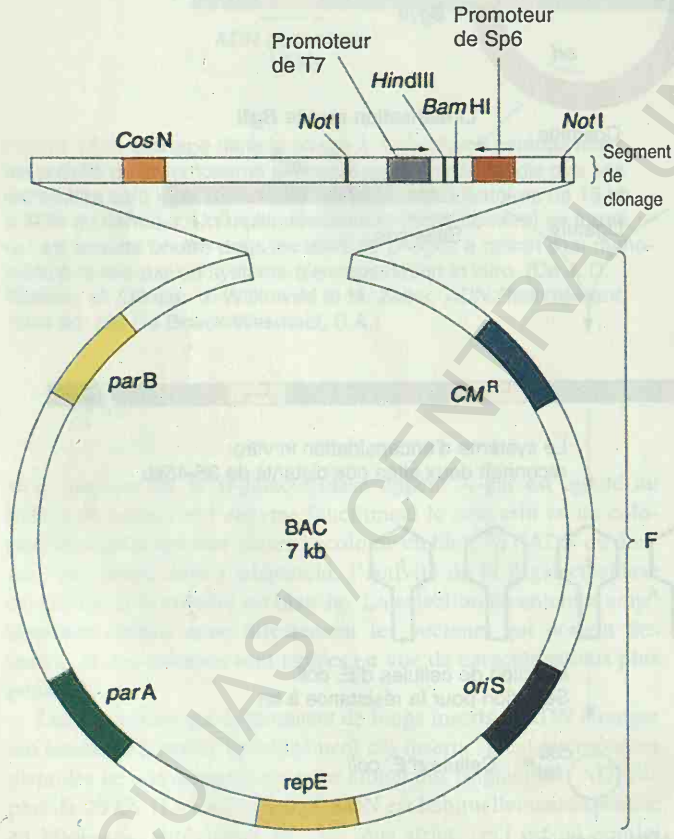


Figure 14-10. Structure d'un chromosome bactérien artificiel (BAC) utilisé pour cloner de long fragments d'ADN de donneur. CM^R est un marqueur sélectionnable de résistance au chloramphénicol. Les gènes *oriS*, *repE* et *parA* sont des gènes de F pour la réplication et la régulation du nombre de copies. *CosN* est le site *cos* du phage λ. *Hin*dIII et *Bam*HII sont les sites de clonage où s'insère l'ADN étranger. Les deux promoteurs sont utilisés pour la trancription des fragments insérés. Les sites *Not*I servent à exciser les fragments insérés.

YAC. L'acronyme YAC signifie **chromosome artificiel de levure** (yeast artificial chromosome, en anglais). Les centromères et télomères de levure, ayant été clonés et caractérisés, peuvent servir à assembler des chromosomes artificiels qui comportent des quantités énormes d'ADN génomique de donneur (jusqu'à 100 kb). Toutefois, alors que les vecteurs décrits plus haut utilisent des bactéries comme hôtes, les YAC exigent des cellules de levure comme hôtes. Etant donné leur capacité de charge importante, les YAC sont employés de routine pour créer des jeux de clones qui couvrent des chromosomes eucaryotiques, voire même des génomes, entiers. Le clonage à l'aide de YAC est discuté en détail aux chapitres 15 et 17.

BAC. Un type de vecteur relativement nouveau qui est utile pour le clonage de grands fragments d'ADN est le **BAC**, pour **chromosome bactérien artificiel** (bacterial artificial chromosome, en anglais). Les BAC ont pour base le facteur F de 7 kb d'*E. coli*. Vous vous souviendrez que ce facteur peut contenir de grands fragments d'ADN d'*E. coli*, sous la forme de dérivés F' (chapitre 10). De manière similaire, les BAC peuvent incorporer des inserts d'ADN étranger qui peuvent atteindre 300 kb, encore que la moyenne soit de 100 kb. Un BAC typique est montré dans la figure 14-10. Bien que la taille maximale des inserts des BAC n'atteigne pas celle des YAC, les BAC présentent un certain nombre d'avantages par rapport à ceux-ci. Premièrement, ils peuvent être isolés et manipulés sur base de la technologie des plasmides bactériens ; deuxièmement, ils forment moins d'inserts hybrides que les YAC.

Message Les vecteurs disponibles pour le clonage dans des cellules hôtes bactériennes sont les plasmides, les phages λ, des hybrides de ceux-ci appelés cosmides et des chromosomes bactériens artificiels dérivés du facteur F. Les chromosomes artificiels de levure servent de vecteurs de clonage dans les cellules de levure.

La préparation d'une banque d'ADN

Nous avons vu que l'objectif principal de la technologie de l'ADN recombinant est de cloner un gène particulier, ou un autre fragment d'ADN génomique, qui intéresse le chercheur. L'approche spécifique qui sera utilisée pour cloner un gène dépend dans une large mesure du gène en question et de ce qu'on sait à son sujet. En général, le processus part d'un échantillon d'ADN, par exemple d'ADN génomique eucaryotique. La première étape consiste à obtenir une large collection de clones préparés à partir de cet échantillon d'ADN initial. Cette collection de clones est appelée une **banque d'ADN**. La préparation de la banque est parfois appelée **clonage à l'aveugle** (shotgun cloning, en anglais) lorsque que l'expérimentateur clone un grand nombre de fragments dans l'espoir qu'un des clones contiendra le gène désiré. La question est ensuite de déterminer de quel clone il s'agit.

Il existe plusieurs catégories de banques selon le vecteur utilisé et la source de l'ADN. Des vecteurs de clonage différents contiennent des quantités d'ADN différentes, de sorte que le choix du vecteur dépend de la taille du génome (ou autre échantillon d'ADN) dont on prépare une banque. Les plasmides et les phages contiennent d'assez petites quantités d'ADN et conviennent mieux pour les petits génomes. Les cosmides et les YAC en intègrent de plus grandes quantités. La facilité de manipulation est un autre facteur important dans le choix du vecteur. Une banque de phage est une

suspension de phages. Une banque de plasmides ou de cosmides est une suspension de bactéries ou un ensemble de cultures bactériennes en tubes ou en boîtes de culture. Pareillement, une banque de YAC est une collection de souches de levures.

Il est aussi important de décider si on préparera une **banque génomique** ou une **banque d'ADNc**. L'**ADNc** ou **ADN complémentaire** est un ADN synthétique préparé à partir de l'ARNm à l'aide de la *transcriptase inverse*, une enzyme spéciale isolée initialement des rétrovirus. Utilisant l'ARNm comme matrice, la transcriptase inverse synthétise une molécule d'ADN à simple brin qui peut servir de matrice pour la synthèse d'un ADN à double brin (figure 14-11). Puisqu'il est synthétisé à partir de l'ARNm, l'ADNc est dépourvu de séquences régulatrices en amont et en aval et, évidemment, d'introns. Ceci signifie que l'ADNc des eucaryotes peut être traduit en une protéine fonctionnelle dans les bactéries, une propriété manifestement importante lorsqu'il s'agit de cloner et de manipuler des gènes eucaryotiques dans des hôtes bactériens.

Le choix entre l'ADN génomique et l'ADNc dépend du problème traité. Si le gène recherché est actif dans un tissu animal ou végétal spécifique, il semble logique de partir de l'ARNm, de le convertir en ADNc et de préparer ensuite une banque d'ADNc. Cette banque devra être enrichie en le gène recherché. Une banque d'ADNc est basée sur les régions du génome qui sont transcrites et sera forcément plus réduite qu'une banque génomique qui contient tout le génome. Bien que les banques génomiques soient plus importantes, elles présentent l'avantage de contenir les gènes sous leur forme native, y compris les introns et les séquences régulatrices en amont et en aval.

Dans certains, cas il est possible limiter la fraction génomique utilisée pour la préparation d'une banque afin de détecter plus aisément le gène recherché. Une telle approche est possible si on sait déjà sur quel chromosome le gène est localisé. Une technique utilisée en génétique moléculaire des mammifères consiste à trier les chromosomes à l'aide d'un *cytomètre de flux*. Une suspension de chromosomes passe dans l'appareil qui les trie en fonction de leurs tailles (cette méthode est décrite de façon plus détaillée au chapitre 17). La fraction chromosomique appropriée est ensuite utilisée pour préparer la banque. Une technique qui convient pour les organismes qui possèdent de petits chromosomes consiste à soumettre les chromosomes entiers à une électrophorèse sur gel à champ alterné (pulse field gel electrophoresis ou PFGE). Cette méthode ressemble à l'électrophorèse classique mais utilise des champs électriques dont l'orientation oscille entre différentes directions, permettant aux chromosomes entiers (qui sont d'énormes molécules d'ADN) de serpenter à travers le gel pour atteindre des positions qui sont fonction de leurs tailles. (Cette méthode est également décrite au chapitre 17.) Le chromosome recherché peut être identifié sur le gel au moyen d'une sonde spécifique (voir plus loin). Le chromosome est ensuite découpé, élué du gel et utilisé pour construire une banque spécifique.

Comment un expérimentateur peut-il déterminer si une librairie est suffisamment importante pour contenir avec un raisonnable degré de certitude un exemplaire de n'importe quelle séquence intéressante ? Il existe des formules pour calculer le nombre minimum de clones nécessaires mais on peut se faire une idée approximative de l'ordre de grandeur de la banque en prenant simplement la taille totale du génome et en la divisant par la taille moyenne des inserts portés par le vecteur utilisé. En général, ce nombre sera au moins doublé mais il fournit une estimation de la tâche que représente la construction d'une banque.

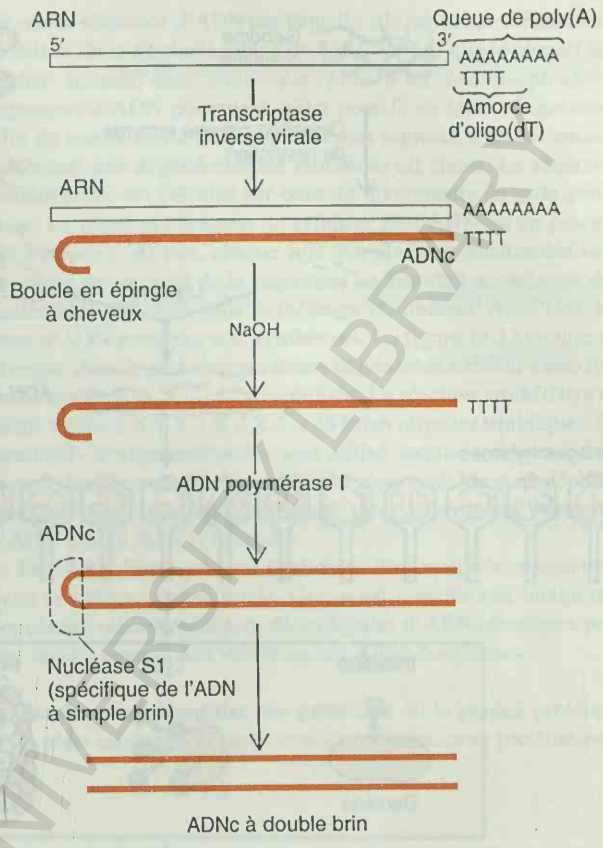


Figure 14-11. La synthèse d'ADNc bicaténaire à partir d'ARNm. Un court oligo(dT) est hybridé à l'extrémité polyadenylée de l'ARNm. Le segment d'oligo(dT) est utilisé comme amorce par la transcriptase inverse qui utilise l'ARN comme matrice pour synthétiser un brin d'ADN complémentaire. Le brin d'ADN synthétisé se termine par une boucle en épingle à cheveux. La fibre d'ARN est détruite par traitement à la soude et l'épingle à cheveux est alors utilisée comme amorce par l'ADN polymérase I pour compléter la fibre d'ADN complémentaire. L'épingle à cheveux est ensuite coupée par action de la nucléase S1 (qui n'agit que sur la boucle à simple brin) pour produire la molécule à double brin d'ADNc. (D'après J. D. Watson, J. Tooze et D. T. Kurtz, *Recombinant DNA : A Short Course*. Copyright ©1983 par W. H. Freeman and Company.)

Message L'isolement du clone d'un gène spécifique commence par la construction d'une banque d'ADN génomique ou d'ADNc, si possible enrichie en séquences contenant le gène recherché.

L'identification des clones spécifiques à l'aide de sondes

La banque, qui peut contenir jusqu'à plusieurs centaines de milliers de fragments clonés, doit être criblée pour identifier la molé-

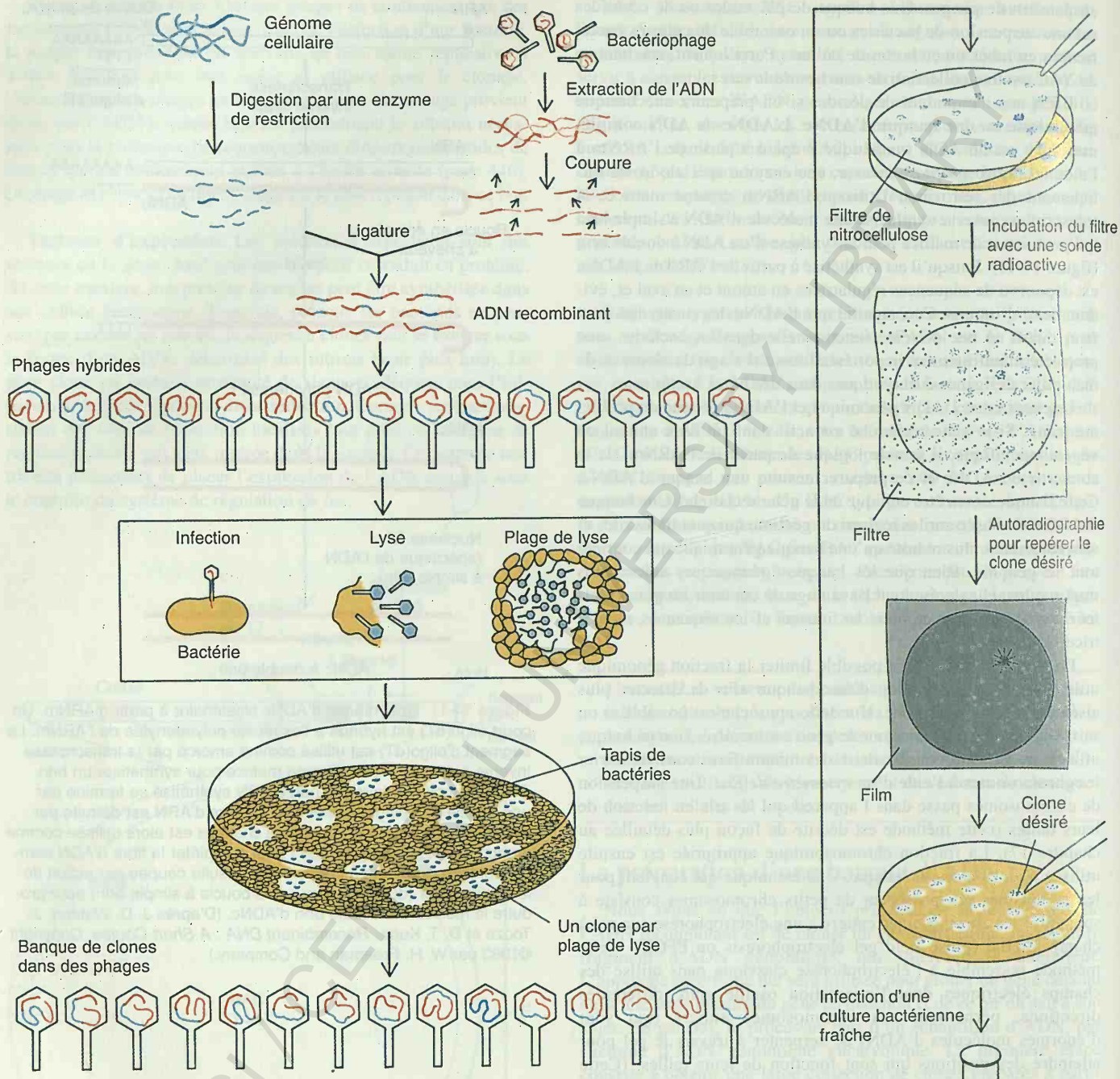


Figure 14-12. (a) Une banque génomique peut être construite en clonant des fragments d'ADN dans un bactériophage λ. Lorsque les phages obtenus sont étalés sur un tapis de bactéries, chacun des phages forme une plage de lyse. Tous les phages contenus dans une plage descendent du même phage parental et contiennent un même segment d'ADN cloné. Les phages de chacune des plages contiennent un segment d'ADN cloné différent. L'étape suivante consiste à identifier parmi ces plages celles qui contiennent le gène que l'on désire étudier (bleu foncé). Ceci peut se faire en utilisant une sonde constituée d'ADN ou d'ARN dont on sait qu'elle correspond au gène recherché. (b) On peut réaliser, sur un filtre de nitrocellulose, une empreinte des plages de lyse obtenues sur un tapis bactérien. Le filtre est traité de manière à dissoudre les protéines qui constituent les enveloppes des phages et à libérer leur ADN recombinant. Celui-ci est ensuite dénaturé de manière à le faire adhérer au filtre. Celui-ci est incubé dans une solution qui contient la sonde marquée : une copie d'ADNc de l'ARNm correspondant au gène recherché. La sonde s'hybride à tous les ADN phagiques recombinants qui portent un segment qui lui est homologue et la position des ADN qui s'hybrident avec la sonde peut être repérée par autoradiographie. La plage correspondante peut être récupérée à partir de la boîte matrice et les phages qu'elle contient peuvent être multipliés sur des bactéries fraîches. Le lysat de phage obtenu contient une population homogène d'ADN recombinant à partir de laquelle il est possible d'isoler le gène que l'on recherche. (D'après R. A. Weinberg, «A Molecular Basis of Cancer,» et P. Leder, «The Genetics of Antibody Diversity.» Copyright ©1983, 1982 by Scientific American, Inc.Tous droits réservés.)

cule d'ADN recombinant qui contient le gène recherché. Ceci est effectué grâce à une sonde spécifique qui reconnaîtra et marquera le clone à identifier. Au sens large, il y a deux types de sondes, celles qui reconnaissent l'ADN et celles qui reconnaissent une protéine.

Sondes pour identifier l'ADN. L'utilisation de ces sondes repose sur la tendance naturelle d'un simple brin d'acide nucléique à reconnaître et à s'hybrider avec un brin possédant une séquence de bases complémentaire. Une sonde, qui est elle-même de l'ADN, pourra, une fois dénaturée (rendue monocaténaire), reconnaître et se lier à d'autres ADN dénaturés similaires présents dans la banque. La recherche de clones spécifiques dans une banque comporte deux étapes. Tout d'abord, les colonies ou les plages de lyse sur boîte de Petri de la banque sont transférées sur des membranes absorbantes (souvent des filtres de nitrocellulose) qui sont simplement déposées à la surface du milieu. La membrane est retirée et les colonies ou plages de lyse adhérant à sa surface sont lysées in situ et leur ADN dénaturé. L'étape suivante consiste à tremper la membrane dans une solution de sonde marquée spécifique de l'ADN recherché. En général, la sonde elle-même est un segment d'ADN cloné dont la séquence est homologue de celle du gène cherché. La sonde d'ADN doit être dénaturée ; elle ne se liera alors qu'à l'ADN du clone désiré. La position d'un clone positif sera indiquée par la position du marquage, souvent une tache sur un autoradiogramme. Cette technique de criblage d'une banque est illustrée dans la figure 14-12.

D'où provient l'ADN qui sert à faire une sonde ? A première vue, il semble que si on possède un ADN qui peut servir de sonde, il ne soit pas nécessaire de le cloner. L'ADN peut provenir de plusieurs sources. Une première source est l'ADNc d'un tissu qui exprime le gène d'intérêt. Le principe est que, lorsque l'ARNm d'un gène est abondant dans un tissu, si on prépare des ADNc à partir de ce tissu et qu'on les insère individuellement dans un vecteur, beaucoup de ces inserts correspondront à ce gène. Les réticulocytes de mammifères, par exemple, dont 90% des ARNm sont du messager du gène de la β-globine, seraient une bonne source d'ARNm pour la synthèse d'une sonde d'ADNc destinée à identifier un gène de globine génomique. Dans ce cas, on sonderait une banque génomique. Evidemment, la nécessité d' une telle analyse dépend des questions qui se posent au sujet du gène. Si seule la séquence transcrite est utile, le clone d'ADNc suffira à fournir cette information. Par contre, si les introns et la région de contrôle sont nécessaires, le clone génomique est indispensable.

Une autre source d'ADN pour la construction d'une sonde est le gène similaire d'un organisme apparenté. Si, par exemple, un gène a été cloné chez un champignon ascomycète comme *Neurospora*, il est probable que ce gène pourra servir de sonde pour identifier le gène homologue du champignon apparenté *Podospora*. L'efficacité de cette méthode dépend de la conservation des séquences au cours de l'évolution. Même si l'ADN de la sonde et l'ADN du clone recherché ne sont pas identiques, ils sont souvent suffisamment similaires pour permettre l'hybridation. A titre de plaisanterie, cette méthode est appelée «clonage par téléphone» parce qu'il vous suffit de téléphoner à un collègue qui a cloné le gène intéressant chez un organisme apparenté pour que votre travail de clonage soit déjà bien avancé.

Une sonde d'ADN peut être synthétisée si le produit protéique du gène recherché est connu et si une partie de sa séquence d'acides aminés a été déterminée. Les sondes synthétiques sont conçues sur base du code génétique, de telle sorte que la séquence d'acide aminé doit simplement être traduite en sens inverse pour obtenir la séquence d'ADN par laquelle elle est codée. Néanmoins, en raison de la dégénérescence du code—le fait que la plupart des acides aminés sont codés par plus d'un codon—plusieurs sèquences d'ADN pourraient coder pour la protéine en question. Afin de tourner cette difficulté, un court segment d'acides aminés présentant une dégénérescence minimum est choisi. La séquence nucléotidique est calculée sur base du dictionnaire du code génétique. La réaction chimique de synthèse de l'ADN est un processus à étapes ; dès lors, chaque fois que plusieurs nucléotides sont possibles en un point de la séquence, on introduit un mélange des nucléotides possibles dans le mélange réactionnel. Ainsi tous les brins d'ADN possibles sont synthétisés. La figure 14-13 montre un exemple dans lequel cinq positions dégénérées existent avec, respectivement, 2, 3, 2, 2 et 2 possibilités. La réaction synthétisera en même temps 2 X 3 X 2 X 2 X 2 = 48 brins oligonucléotidiques. Ce «cocktail» d'oligonucléotides sera utilisé comme sonde et le brin correct dans ce cocktail reconnaîtra le gène visé. Vingt nucléotides confèrent une spécificité suffisante pour trouver une séquence d'ADN unique dans la banque.

Des ARN libres peuvent également être marqués radioactivement et utilisés comme sonde. Ceci n'est possible que lorsqu'une population relativement pure de molécules d'ARN identiques peut être isolée, comme de l'ARNr ou des ARNt fractionnés.

Sondes pour identifier des protéines. Si le produit protéique d'un gène est connu et isolé sous forme pure, cette protéine peut

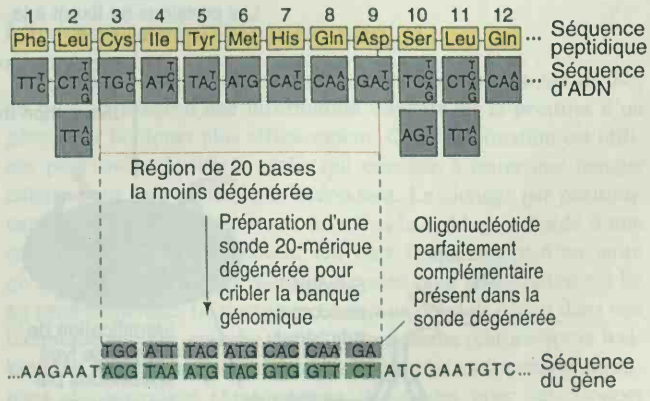


Figure 14-13. Un court segment de séquence de protéine est utilisé pour préparer une série d'oligonucléotides redondants devant servir de sonde pour recouvrer le gène qui code pour cette protéine. Une des sondes du mélange correspondra parfaitement avec la séquence du gène. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

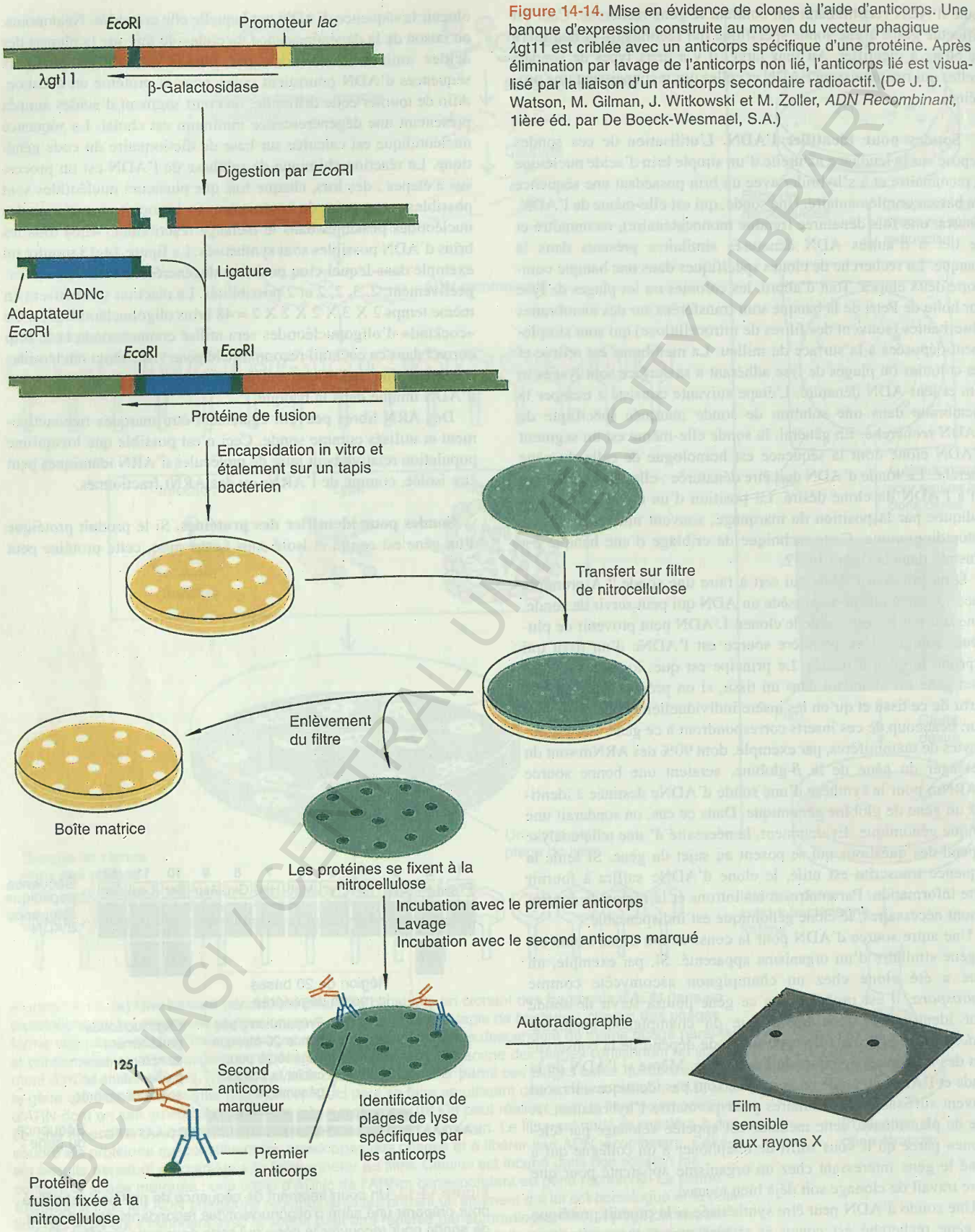


Figure 14-14. Mise en évidence de clones à l'aide d'anticorps. Une banque d'expression construite au moyen du vecteur phagique λgt11 est criblée avec un anticorps spécifique d'une protéine. Après élimination par lavage de l'anticorps non lié, l'anticorps lié est visualisé par la liaison d'un anticorps secondaire radioactif. (De J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *ADN Recombinant*, 1ière éd. par De Boeck-Wesmael, S.A.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

être utilisée pour détecter le clone du gène correspondant dans une banque. Un anticorps est préparé contre la protéine et cet anticorps est utilisé pour cribler une **banque d'expression**. Ces banques sont préparées au moyen de vecteurs d'expression destinés à produire des taux élevés d'une protéine bactérienne. Afin de construire cette banque, l'ADNc est inséré dans le vecteur en phase avec la protéine bactérienne et les cellules produisent une protéine de fusion. Une membrane est déposée à la surface du milieu et retirée en emportant l'empreinte des colonies. Elle est séchée et plongée dans une solution de l'anticorps. Les clones positifs sont identifiés à l'aide d'un deuxième anticorps dressé contre le premier ; le deuxième anticorps est marqué au moyen d'un isotope radioactif ou d'un réactif chimique qui produira de la fluorescence ou fournira un produit coloré. Par la détection de la protéine correcte, l'anticorps identifie le clone contenant le gène qui a synthétisé la protéine. Ce processus est décrit dans la figure 14-14.

Message Un gène cloné peut être détecté dans une banque à l'aide de sondes qui reconnaissent soit la séquence d'ADN de ce gène, soit son produit protéique.

Identification de clones spécifiques par complémentation de fonction

Les gènes clonés peuvent également être détectés par leur capacité à conférer une fonction absente dans un récepteur de transformation.Cette méthode est appelée **complémentation de fonction**. Nous avons déjà parlé de la transformation chez les procaryotes (au chapitre 10), mais les eucaryotes peuvent également être transformés. Les protocoles varient selon les eucaryotes mais en général un traitement spécial de la cellule réceptrice est nécessaire. Pour transformer les champignons, par exemple, les parois cellulaires doivent généralement être éliminées enzymatiquement. Supposons que vous ayez isolé un mutant affecté dans un processus biologique qui vous intéresse. Pour la facilité, supposons qu'il s'agit d'une mutation auxotrophe. Les cellules du mutant auxotrophe utilisé comme récepteur sont transformées à l'aide de l'ADN de la banque et étalées sur milieu minimum. Les clones qui contiennent l'allèle sauvage (provenant de la culture de type sauvage utilisée pour construire la banque) transformeront les auxotrophes en prototrophes et permettront la croissance sur le milieu minimum.

La raison pour laquelle cette méthode de transformation donne des résultats est que le fragment transformant complémente fonctionnellement la déficience causée par l'allèle muté dans le récepteur. A première vue cet aspect de la transformation est différent de celui qui a été développé au chapitre 4, c'est-à-dire de la production d'un phénotype sauvage par la réunion de deux génomes mutants. Néanmoins, le vecteur transformant apporte quelque chose (l'allèle sauvage cherché) qui fait défaut dans le génome du récepteur et celui-ci fournit quelque chose (tout le reste du génome) qui manque au vecteur ; il s'agit donc bien d'une forme de complémentation.

Si le récepteur de transformation est un organisme dans lequel les vecteurs plasmidiques se répliquent de manière autonome (surtout les bactéries et les levures), l'insert transformant peut être récolté en isolant le plasmide.Toutefois, comme nous le verrons, le vecteur ne peut pas se répliquer chez la plupart des organismes eucaryotes et doit s'insérer dans le génome pour réaliser une transformation stable. Dans ce cas, le fragment transformant est relativement inaccessible et doit être récolté parmi les clones positifs de la banque. Cette méthode utilise une banque dont les clones sont étalés sous forme d'une collection de cultures bactériennes numérotées en tubes ou en boîtes de culture («microtiter»). L'ADN est isolé en bloc de toutes les souches d'un sous-ensemble spécifique de la banque et utilisé pour un essai de transformation. Par un processus de réduction progressive de la taille des sous-ensembles qui transforment le récepteur avec succès, le clone contenant l'allèle sauvage peut être identifié (figure 14-15).

Notons que dans ce protocole l'ADN cloné dans un hôte (en général une bactérie) est ajouté à des cellules de l'organisme en cours d'analyse génétique, souvent un eucaryote. Pour cette raison, le vecteur transformant ne se répliquera presque certainement pas dans le nouvel hôte. On constate que les transformants contiennent le vecteur porteur de l'allèle sauvage intégré dans un des chromosomes du récepteur à un endroit différent du locus muté dans le récepteur. C'est ce qu'on appelle une **intégration ectopique** (figure 14-16). Dans d'autres cas, l'allèle sauvage remplace la région mutée par un processus de double crossing-over.

Si un gène eucaryotique est cloné dans un vecteur procaryotique possédant une origine de réplication eucaryotique, le vecteur sera capable de se répliqer dans les cellules bactériennes et eucaryotiques et l'insertion dans le chromosome n'est pas essentielle. Ces vecteurs sont appelés des **vecteurs navettes** (shuttle vector, en anglais). Sans origine de réplication, l'ADN exogène doit s'intégrer dans le chromosome eucaryotique pour réaliser une transformation stable.

Message Les gènes clonés peuvent être sélectionnés en utilisant leur ADN pour transformer et complémenter des allèles nuls dans des cellules réceptrices.

Clonage par positionnement

Le terme *clonage par positionnement* s'applique à toute méthode qui fait usage d'une information concernant la position d'un gène pour le cloner plus efficacement. Cette information est utilisée pour éviter la lourde tâche qui consiste à tester une banque entière pour trouver le clone intéressant. Le clonage par positionnement fait souvent intervenir à la fois le criblage à l'aide d'une sonde et la complémentation. On part fréquemment d'un autre gène cloné ou d'un autre marqueur connu pour être étroitement lié au gène recherché. Le marqueur lié sert de point de départ dans une technique appelée **marche sur le chromosome** (chromosome walking, en anglais) qui aboutira au gène désiré. Les fragments terminaux du marqueur cloné servent de sondes pour sélectionner d'autres clones dans la banque. Ces sondes détecteront des clones correspondants à des régions d'ADN qui chevauchent le clone initial. Des cartes de restriction (pages 449 à 451) de l'ADN de ce

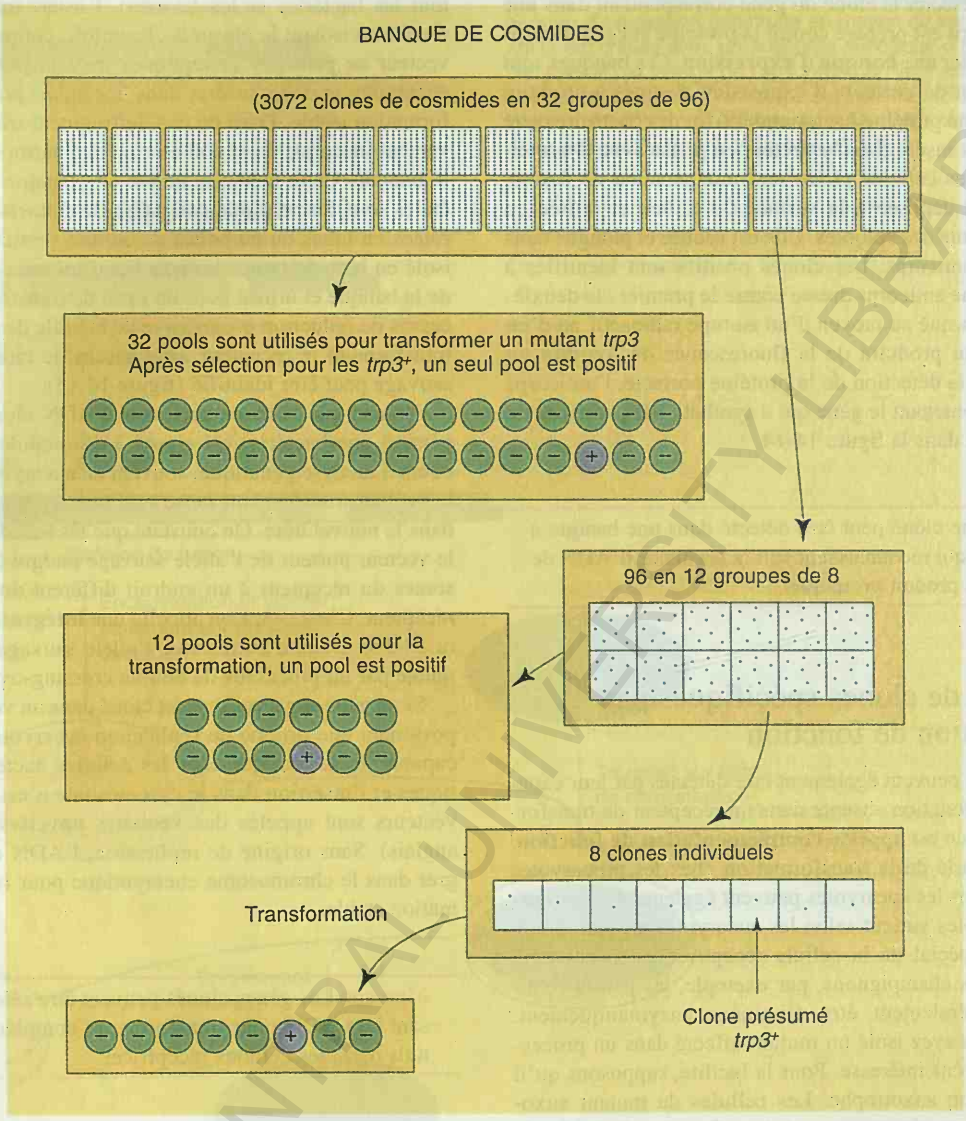


Figure 14-15. Mise en évidence d'un gène cloné en utilisant des échantillons groupés (pool) d'ADN de plus en plus petits pour la transformation. Dans cet exemple, on recherche le gène *trp3* de *Neurospora*. (D'après J. R. S. Fincham, *Genetic Analysis*. Copyright ©1995 par Blackwell.)

deuxième jeu de clones sont établies et des fragments terminaux sont utilisés pour amorcer un nouveau cycle de sélection de clones chevauchants dans la banque. La technique de marche sur le chromosome progresse donc dans deux directions à partir du point de départ. Chaque clone pourra être séquencé ou cartographié, selon le but de l'analyse. La figure 14-17 résume la technique de la marche sur le chromosome.

Il arrive qu'un cosmide porteur du marqueur lié contienne aussi le gène cherché. Dans ce cas, le sous-clonage et la transformation permettront de préciser la région concernée du cosmide. La disponibilité d'un grand nombre de marqueurs d'ADN neutres (polymorphismes de longueur des fragments de restriction—voir page 485) dispersés le long de la plupart des génomes a également fourni beaucoup de points de départ. Le clonage par positionnement s'est montré particulièrement utile pour le clonage de gènes humains dont beaucoup n'ont pas de fonction connue et ne peuvent pas être sélectionnés sur base d'un test de complémentation. Néanmoins, il faut en définitive un critère d'évaluation pour chacune des étapes de la marche vers le gène cherché et ces critères dépendront des gènes individuels concernés.

Clonage d'un gène par étiquetage

L'étiquetage est une méthode de clonage qui identifie le gène désiré en y induisant une mutation et en utilisant une séquence d'ADN définie comme mutagène insertionnel. Cette séquence sert ensuite d'étiquette pour identifier le gène. Lorsque de l'ADN exogène est introduit par transformation ou par une autre méthode, il peut s'intégrer dans un chromosome et devenir une partie du géno-

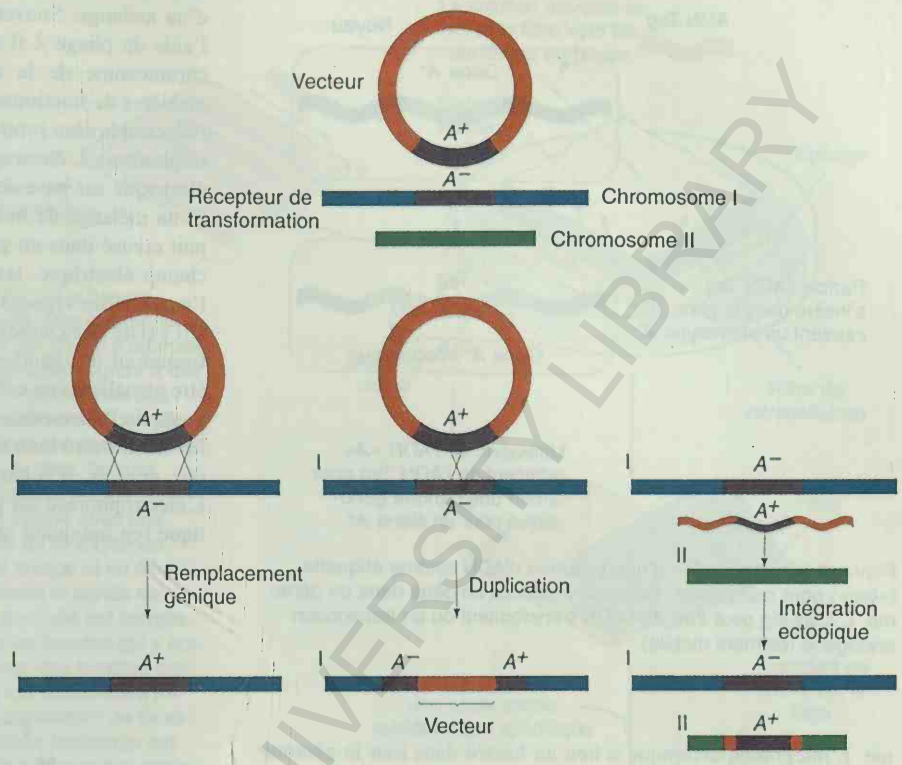


Figure 14-16. Les sorts possibles de l'ADN transformant. Un donneur de type sauvage porteur de l'allèle A^+ cloné dans un vecteur bactérien est utilisé pour transformer un récepteur A^- par une des trois méthodes d'insertion décrites. NOTE : Le récepteur est en général de la même espèce que le donneur d'ADN, soit procaryote, soit eucaryote. Deux chromosomes récepteurs, I et II, sont montrés.

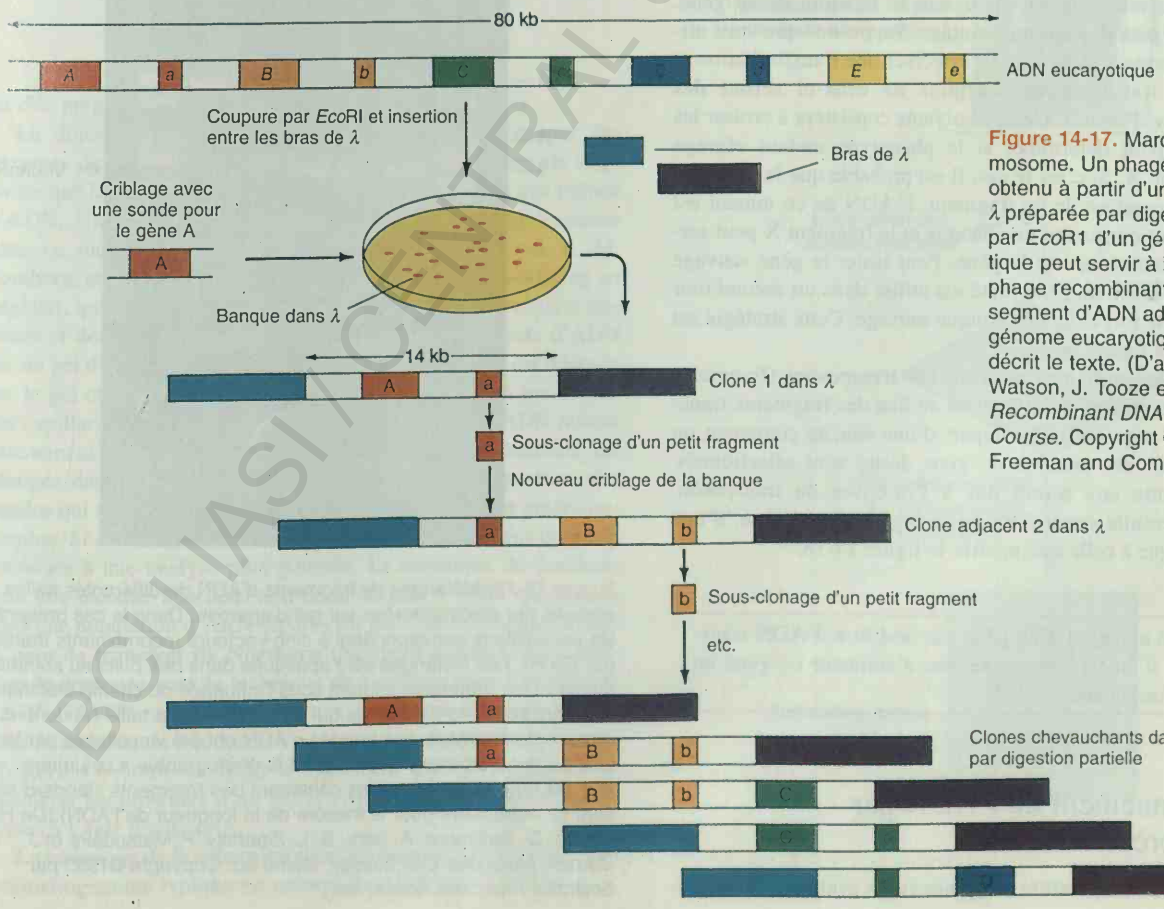


Figure 14-17. Marche sur le chromosome. Un phage recombinant obtenu à partir d'une banque dans λ préparée par *Eco*R1 d'un génome eucaryotique peut servir à isoler un autre phage recombinant contenant un segment d'ADN adjacent sur le génome eucaryotique, comme le décrit le texte. (D'après J. D. Watson, J. Tooze et D. T. Kurtz, *Recombinant DNA : A Short Course*. Copyright ©1983 by W. H. Freeman and Company.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

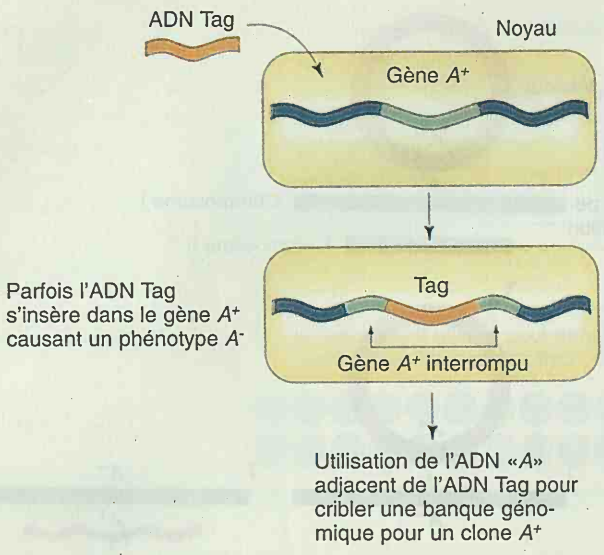


Figure 14-18. Utilisation d'une insertion d'ADN comme étiquette («tag») pour marquer et mettre en évidence un gène dans un génome. L'ADN tag peut être de l'ADN transformant ou un transposon endogène (élément mobile).

me. L'intégration ectopique a lieu au hasard dans tout le génome et apparemment aucun segment d'ADN chromosomique n'est immun vis-à-vis d'une telle intégration. Lorsque l'intégration se produit dans ou à proximité d'un gène, le fragment qui s'intègre agit comme un mutagène en abolissant la fonction de ce gène. Cette propriété peut devenir un avantage. Supposons que vous utilisiez un fragment exogène X pour effectuer une transformation et recueillir des transformants. Certains de ceux-ci seront des mutants du gène d'intérêt. L'étape suivante consistera à croiser les transformants pour déterminer si le phénotype mutant ségrège avec le fragment X. Si c'est le cas, il est probable que la mutation résulte de l'intégration de ce fragment. L'ADN de ce mutant est alors utilisé pour construire une banque et le fragment X peut servir de sonde pour récupérer le gène. Pour isoler le gène sauvage intact, un sous-clone du gène muté est utilisé dans un second tour de criblage, cette fois avec une banque sauvage. Cette stratégie est résumée dans la figure 14-18.

Une approche similaire tire profit des transposons (fragments d'ADN mobile) en tant qu'étiquettes au lieu des fragments transformants (voir page 640). Au départ d'une souche contenant un transposon actif, des mutants du gène désiré sont sélectionnés. Beaucoup d'entre eux seront dûs à l'insertion du transposon. Celui-ci peut ensuite servir d'étiquette pour isoler le gène, d'une manière analogue à celle que montre la figure 14-18.

Message La mutation d'un gène par insertion d'ADN transformant ou d'un transposon permet d'étiqueter ce gène en vue de son isolement.

Le fractionnement de l'ADN par électrophorèse

Au cours des manipulation des gènes et des génomes, il est souvent nécessaire d'isoler des molécules d'ADN spécifiques à partir d'un mélange. Souvenez-vous par exemple que lors du clonage à l'aide du phage λ il était nécessaire de séparer les deux bras du chromosome de la région centrale inutile. Il existe plusieurs manières de fractionner l'ADN mais la méthode la plus utilisée est l'électrophorèse (voir à la page 93 le dessin d'un appareil d'électrophorèse). L'électrophorèse sépare des molécules dans un champ électrique sur base de leur charge, de leur taille et de leur forme. Si un mélange de molécules linéaires d'ADN est déposé dans un puit creusé dans un gel d'agarose à proximité de la cathode d'un champ électrique, les molécules migreront à travers le gel vers l'anode à des vitesses qui dépendent de leur taille. C'est pourquoi, s'il existe des classes de tailles différentes dans le mélange, elles formeront des bandes distinctes dans le gel. Ces bandes peuvent être visualisées en colorant l'ADN au bromure d'éthidium qui provoque la fluorescence de l'ADN en lumière UV (figure 14-19). Si les bandes sont bien séparées, une bande individuelle est découpée du gel et l'échantillon d'ADN purifié en est extrait. L'électrophorèse sur gel peut donc jouer à la fois un rôle diagnostique (en indiquant quelles tailles de molécules sont présentes) et

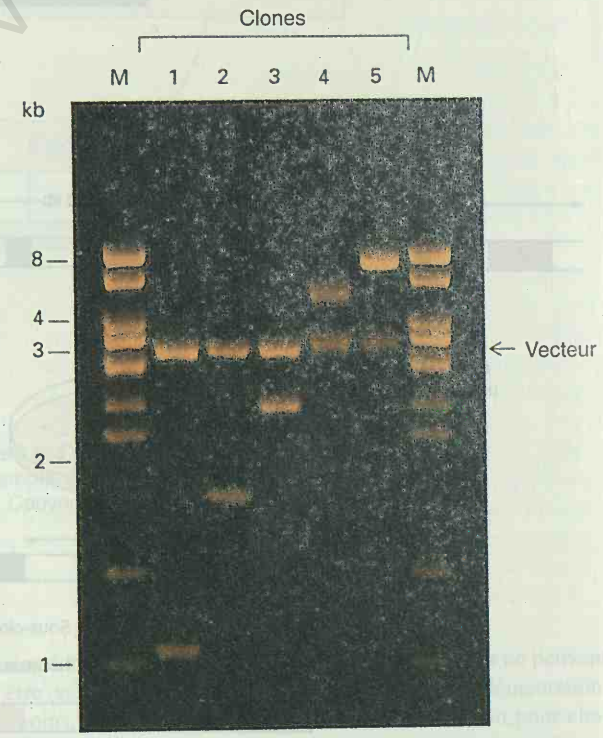


Figure 14-19. Mélanges de fragments d'ADN de différentes tailles séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Dans le cas présent, les échantillons correspondent à cinq vecteurs recombinants traités par *Eco*RI. Les mélanges sont appliqués dans des puits au sommet du gel et les fragments migrent sous l'influence du champ électrique vers des positions différentes qui dépendent de la taille (et donc du nombre de charges). Les bandes d'ADN ont été visualisées par la coloration au bromure d'éthidium et la photographie à la lumière U.V. (M représente les pistes contenant des fragments standard servant de marqueurs pour la mesure de la longueur de l'ADN).(De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

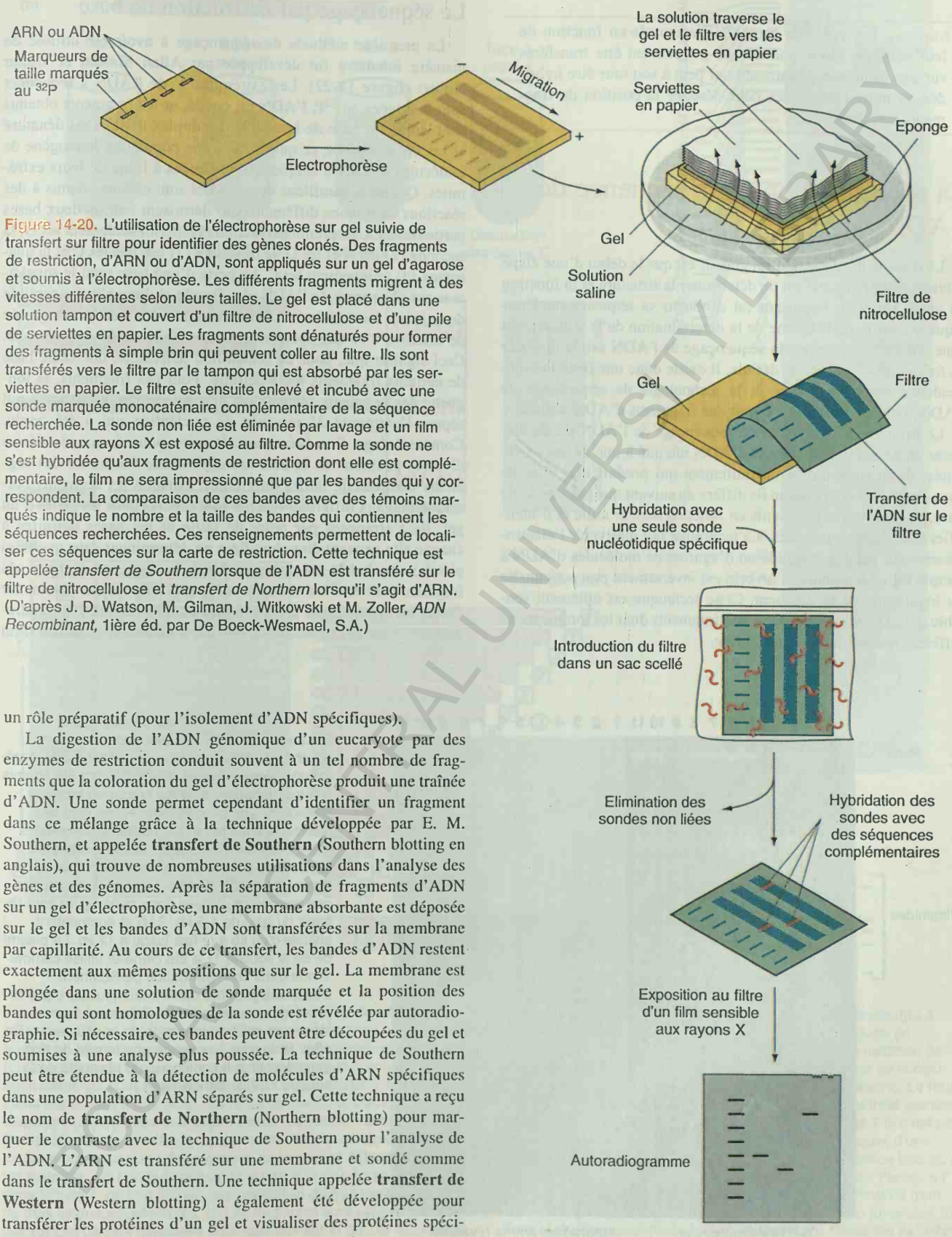


Figure 14-20. L'utilisation de l'électrophorèse sur gel suivie de transfert sur filtre pour identifier des gènes clonés. Des fragments de restriction, d'ARN ou d'ADN, sont appliqués sur un gel d'agarose et soumis à l'électrophorèse. Les différents fragments migrent à des vitesses différentes selon leurs tailles. Le gel est placé dans une solution tampon et couvert d'un filtre de nitrocellulose et d'une pile de serviettes en papier. Les fragments sont dénaturés pour former des fragments à simple brin qui peuvent coller au filtre. Ils sont transférés vers le filtre par le tampon qui est absorbé par les serviettes en papier. Le filtre est ensuite enlevé et incubé avec une sonde marquée monocaténaire complémentaire de la séquence recherchée. La sonde non liée est éliminée par lavage et un film sensible aux rayons X est exposé au filtre. Comme la sonde ne s'est hybridée qu'aux fragments de restriction dont elle est complémentaire, le film ne sera impressionné que par les bandes qui y correspondent. La comparaison de ces bandes avec des témoins marqués indique le nombre et la taille des bandes qui contiennent les séquences recherchées. Ces renseignements permettent de localiser ces séquences sur la carte de restriction. Cette technique est appelée *transfert de Southern* lorsque de l'ADN est transféré sur le filtre de nitrocellulose et *transfert de Northern* lorsqu'il s'agit d'ARN. (D'après J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *ADN Recombinant,* 1ière éd. par De Boeck-Wesmael, S.A.)

un rôle préparatif (pour l'isolement d'ADN spécifiques).

La digestion de l'ADN génomique d'un eucaryote par des enzymes de restriction conduit souvent à un tel nombre de fragments que la coloration du gel d'électrophorèse produit une traînée d'ADN. Une sonde permet cependant d'identifier un fragment dans ce mélange grâce à la technique développée par E. M. Southern, et appelée **transfert de Southern** (Southern blotting en anglais), qui trouve de nombreuses utilisations dans l'analyse des gènes et des génomes. Après la séparation de fragments d'ADN sur un gel d'électrophorèse, une membrane absorbante est déposée sur le gel et les bandes d'ADN sont transférées sur la membrane par capillarité. Au cours de ce transfert, les bandes d'ADN restent exactement aux mêmes positions que sur le gel. La membrane est plongée dans une solution de sonde marquée et la position des bandes qui sont homologues de la sonde est révélée par autoradiographie. Si nécessaire, ces bandes peuvent être découpées du gel et soumises à une analyse plus poussée. La technique de Southern peut être étendue à la détection de molécules d'ARN spécifiques dans une population d'ARN séparés sur gel. Cette technique a reçu le nom de **transfert de Northern** (Northern blotting) pour marquer le contraste avec la technique de Southern pour l'analyse de l'ADN. L'ARN est transféré sur une membrane et sondé comme dans le transfert de Southern. Une technique appelée **transfert de Western** (Western blotting) a également été développée pour transférer les protéines d'un gel et visualiser des protéines spécifiques à l'aide d'anticorps.

La technique de Southern est illustrée dans la figure 14-20 et un autoradiogramme typique est montré dans la figure 14-21.

BOSTON COLLEGE LIBRARY

Message Les ARN ou les ADN fractionnés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel peuvent être transférés sur une membrane absorbante qui peut à son tour être hybridée au moyen de sondes pour détecter la position de fragments spécifiques.

La détermination de la séquence de l'ADN

La réussite du clonage d'un gène n'est que le début d'une étape suivante dont l'objectif est de déterminer la structure et la fonction du gène. Un point important est d'obtenir sa séquence nucléotidique qui est le stade ultime de la détermination de la structure du gène. Une des exigences du séquençage de l'ADN est de disposer de fragments d'ADN bien définis. Il existe donc une forte interdépendance entre le clonage et la technologie de séquençage de l'ADN, puisque le clonage founit des fragments d'ADN définis.

Le principe des méthodes de séquençage de l'ADN est de disposer au départ d'un fragment d'ADN marqué à une de ses extrémités, de le soumettre à un traitement qui produit une série de sous-fragments dont chacun ne diffère du suivant que par une seule base, de séparer ces fragments en fonction de leur taille et d'identifier leurs bases terminales. La technique fait intervenir l'électrophorèse sur gel d'acrylamide ou d'agarose de molécules d'ADN à simple brin. La mobilité d'un brin est inversément proportionnelle au logarithme de sa longueur. Cette technique est tellement sensible qu'elle permet de séparer des fragments dont les longueurs ne diffèrent que par un seul nucléotide.

Le séquençage par destruction de base

La première méthode de séquençage à avoir été utilisée de manière intensive fut développée par Allan Maxam et Walter Gilbert (figure 14-22). Les extrémités 5' de l'ADN à séquencer sont marquées au ^{32}P, l'ADN est coupé, et les fragments obtenus sont isolés sur base de leur taille. Le duplex d'ADN est dénaturé et ses brins séparés, ce qui procure une population homogène de molécules d'ADN à simple brin marquées à l'une de leurs extrémités. Quatre échantillons de cet ADN sont ensuite soumis à des réactions chimiques différentes qui détruisent une ou deux bases particulières. Une première réaction (1) détruit seulement les G, la seconde (2) les A et les G, la troisième (3) les T et les C et la quatrième (4) uniquement les C. La perte d'une base rend le squelette sucre-phosphate de l'ADN plus fragile et donc plus susceptible de se briser à cet endroit. La concentration des réactifs est ajustée de manière à ce que seulement 1 base cible sur 50 soit détruite. Ceci signifie que, pour un échantillon déterminé, une seule base de certains fragments a été détruite. Pour ces fragments, la longueur des segments obtenus est déterminée par la distance qui sépare l'extrémité 5' marquée du nucléotide qui a été perdu. Comme il s'agit d'un événement aléatoire, pour chaque réactif, les diverses positions de la base correspondante fourniront des segments marqués de tailles différentes. Lorsque les segments correspondant aux différents réactifs sont séparés dans les pistes d'un gel, ils s'arrangent par ordre de taille et les bases détruites à chaque site peuvent être identifiées en déterminant dans quelle(s) piste(s) une bande est apparue. Ainsi, la séquence de bases du fragment peut être lue aisément sur le profil de bandes obtenu sur l'autoradiogramme du gel. La figure 14-22b montre l'autoradiogramme d'un gel de séquence destiné à établir la séquence d'un

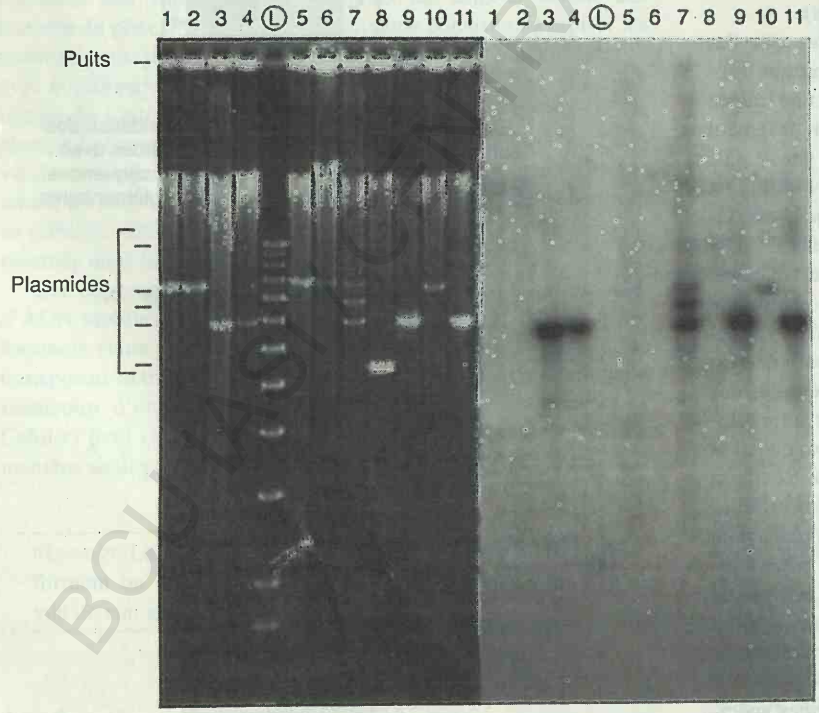


Figure 14-21. Un exemple d'analyse par Southern. Les ADN des mitochondries de 11 souches de *Neurospora* appartenant à des localisations géographiques différentes ont été soumis à l'électrophorèse et le gel coloré au bromure d'éthidium. Les bandes lumineuses sont des plasmides linéaires et les positions de certains d'entre eux sont indiquées. La piste marquée «L»est une échelle de calibration composée de fragments d'ADN de tailles connues. Les tailles des marqueurs visibles dans cette figure sont (à partir du bas) de 1,5 kb, 2 kb et augmentent ensuite d'un kb à la fois jusqu'à 12 kb. Le plasmide de la souche 11 a été cloné et utilisé comme sonde dans une hybridation de Southern. L'autoradiogramme montre que plusieurs autres plasmides possèdent des séquences homologues de celle du plasmide de la souche 11. En effet, la souche 7 possède une famille de trois plamides, tous homologues du plasmide de la souche 11. (De Simon Yang.)

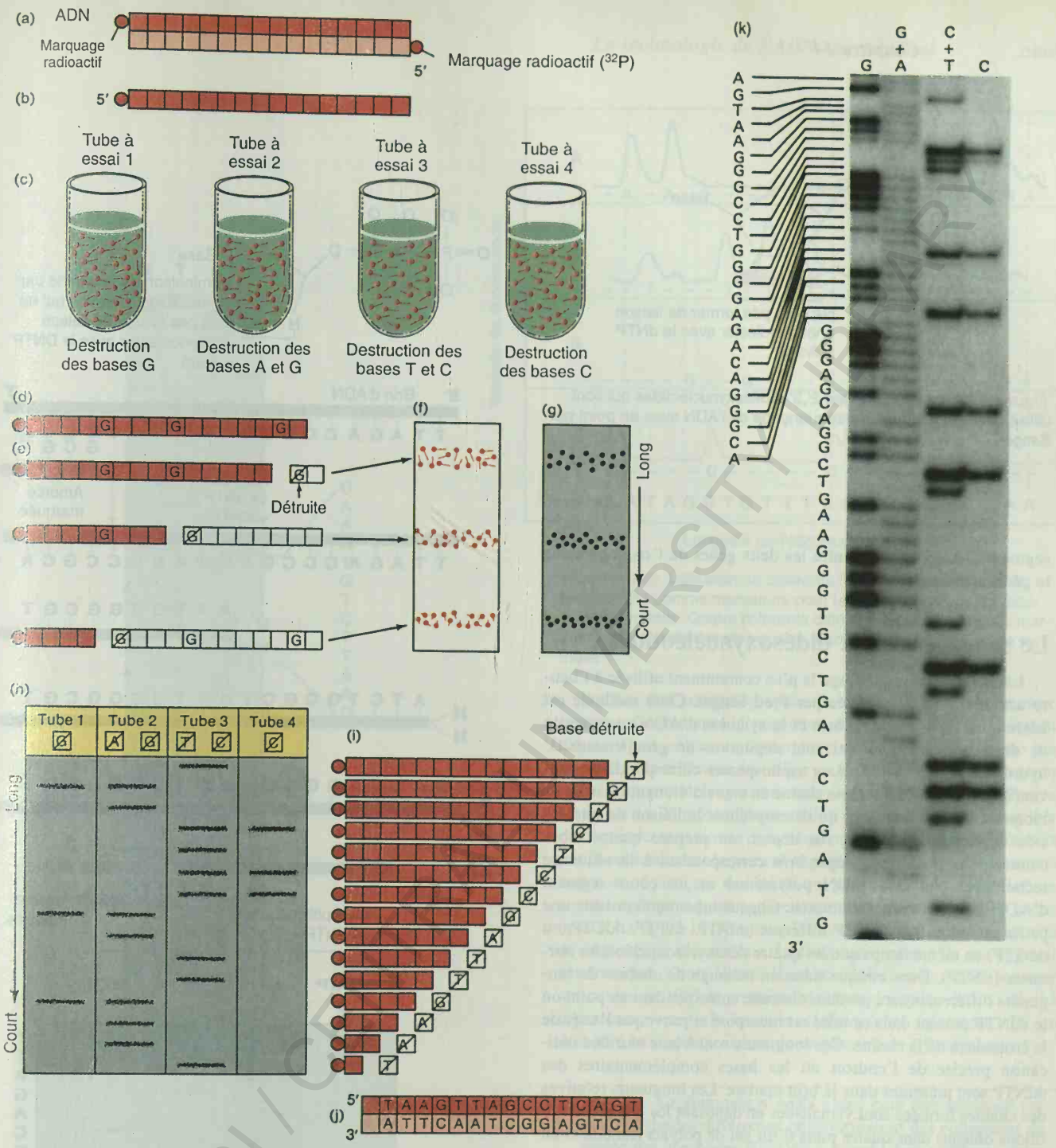
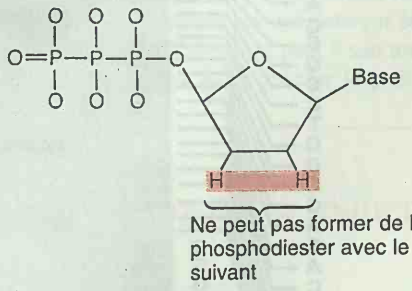


Figure 14-22. La méthode de séquençage de l'ADN développée par Maxam et Gilbert. (a) L'extrémité 5' de chacun des brins est marquée au ^{32}P. (b) Les brins sont séparés et un brin spécifique est conservé. (c) La solution contenant ce brin est divisée en quatre échantillons équivalents qui sont disposés dans des tubes à essais. Chacun des tubes est soumis à une série différente de réactions chimiques qui détruisent une ou deux des quatre bases. La concentration des réactifs est ajustée de manière à ce que la réaction ne soit que partielle, ce qui produit une série de fragments de longueurs différentes. (d) Un exemple : un brin qui contient trois bases G. (e) Après traitement dans le tube 1, ce brin produit une population de fragments *marqués* de trois longueurs différentes. (f) Les fragments sont séparés sur un gel. (g) Les bandes marquées sont repérées sur le gel par autoradiographie. (h) En lisant le gel de bas en haut et en comparant les bandes marquées produites par les quatre réactions, on peut détecter des fragments de plus en plus longs. (i) L'apparition du fragment dans une ou deux pistes indique la base qui a été détruite. (j) La séquence du fragment d'ADN étudié peut en être déduite. (k) Autoradiographie d'un gel de séquence obtenu par la méthode de Maxam et Gilbert. Il montre une portion de la séquence de nucléotides localisée entre les deux gènes de l'α-globine humaine. Le fragment d'ADN étudié a été marqué à son extrémité 5' et traité par des réactifs qui coupent au niveau de G, C, G et A ou C et T (il n'est pas nécessaire que les réactions de clivage soient spécifiques d'une seule base pour obtenir l'information voulue). La séquence telle qu'on peut la lire est indiquée à gauche de l'autoradiographie. Parties a-j adaptées de W. Gilbert et L. Villa-Komaroff, «Useful Proteins from Recombinant Bacteria.» Copyright ©1980 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés. Partie k disponible grâce à l'amabilité de John Hess et C. K. James Shen, University of California, Davis. De F. J. Ayala et J. A. Kiger, Jr., *Modern Genetics,* 2ème éd. Copyright ©1984 by Benjamin/Cummings Publishing Company.)



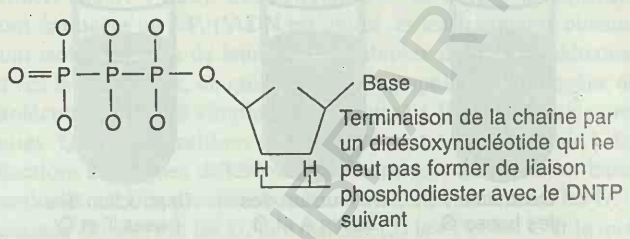


Figure 14-23. La structure des 2',3'-didésoxynucléotides qui sont utilisés dans la méthode de séquençage de l'ADN mise au point par Sanger.

segment d'ADN localisé entre les deux gènes de l'α-globine sur le génome humain.

Le séquençage aux didésoxynucléotides

La méthode de séquençage la plus couramment utilisée à l'heure actuelle a été développée par Fred Sanger. Cette méthode est basée sur l'ADN à simple brin et la synthèse d'ADN en présence de didésoxynucléotides qui sont dépourvus de groupements 3' hydroxyle (figure 14-23). Les triphosphates correspondants peuvent être incorporés dans une chaîne en cours d'élongation mais ils bloquent la synthèse parce qu'ils empêchent la liaison du nucléoside triphosphate suivant. Au départ, on prépare quatre tubes contenant de l'ADN à simple brin correspondant à la séquence recherchée, plus de l'ADN polymérase et un court segment d'ADN marqué servant d'amorce. Chaque tube reçoit ensuite une petite quantité d'un ddNTP différent (ddATP, ddTTP, ddCTP, ou ddGTP) en même temps que les quatre désoxyribonucléotides normaux (dNTP). Dans chaque tube, un mélange de chaînes de longueurs différentes sera produit, chacune correspondant au point où le ddNTP présent dans ce tube est incorporé et provoque l'arrêt de la croissance de la chaîne. Ces longueurs sont à leur tour une indication précise de l'endroit où les bases complémentaires des ddNTP sont présentes dans le brin matrice. Les longueurs relatives des chaînes formées sont visualisées en déposant les quatre échantillons obtenus dans quatre puits d'un gel de polyacrylamide et en les soumettant à l'électrophorèse. Un des nucléosides triphosphates incorporés est radioactif, ce qui permet de déterminer la position des bases par autoradiographie, comme le montrent les figures 14-24 et 14-25.

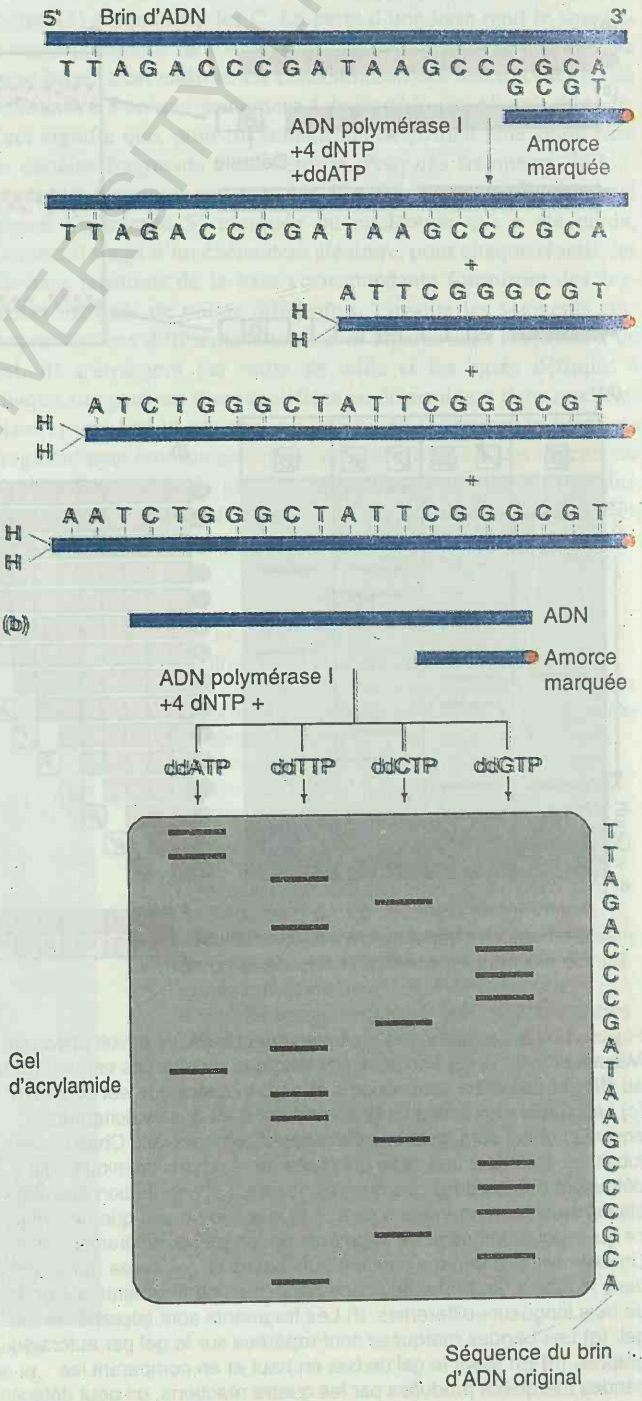


Figure 14-24. La méthode de séquençage aux didésoxynucléotides. (a) Une amorce marquée (conçue sur base des séquences flanquantes du vecteur) est utilisée pour entamer la synthèse de l'ADN. La synthèse est arrêtée au hasard par l'addition d'un des quatre didésoxynucléotides (le ddATP est montré ici). (b)Les fragments obtenus sont séparés électrophorétiquement et soumis à l'autoradiographie. (De J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *ADN Recombinant,* 1ière éd. par De Boeck-Wesmael, S.A.)

BCU - UNIVERSITY LIBRARY

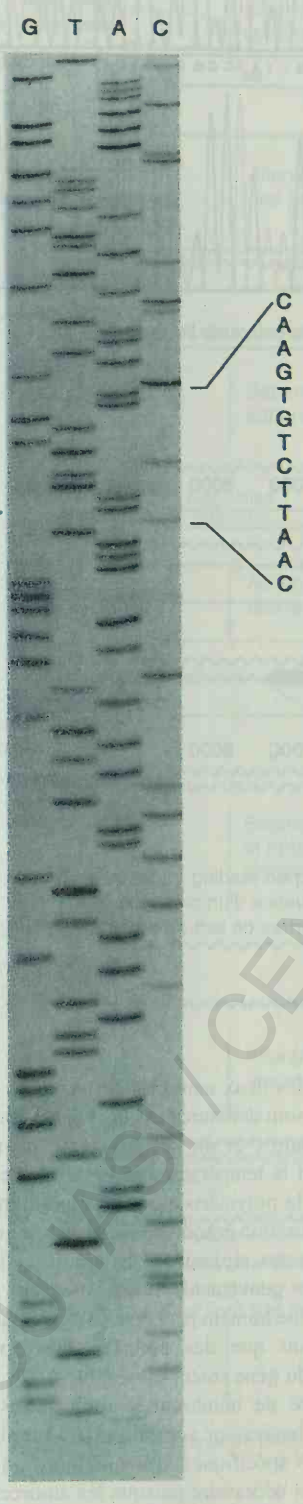


Figure 14-25. Gel de séquence obtenu par la méthode de Sanger. La séquence lue est montrée à droite. (Photographie de Loida Escote-Carlson.)

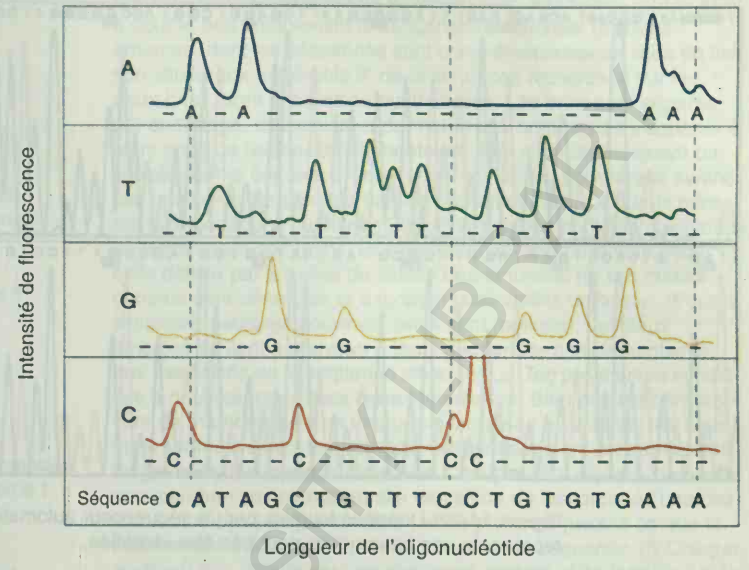


Figure 14-26. Utilisation de colorants fluorescents au lieu de la radioactivité comme marqueurs pour le séquençage par les didésoxynucléotides. Quatre colorants différents sont utilisés pour marquer les amorces dans les quatre réactions de terminaison de synthèse.

Au lieu de l'autoradiographie, il est possible d'utiliser la détection par fluorescence d'étiquettes fixées aux amorces nucléotidiques. Dans ce cas un fluorophore différent émettant à une longueur d'onde différente est utilisé pour chacune des quatre réactions mais les quatre mélanges sont soumis ensemble à l'électrophorèse. La figure 14-26 montre la succession des pics colorés obtenus, permettant la lecture directe de la séquence nucléotidique. La détection par fluorescence est largement exploitée dans les appareils automatiques de séquençage de l'ADN qui peuvent lire jusqu'à 450 bases en une opération ; des appareils améliorés devraient faire encore mieux. La figure 14-27 montre les données fournies par un appareil de séquençage automatique. Utilisant une batterie de ces appareils automatiques, Craig Venter, Hamilton Smith et leurs collaborateurs ont publié en 1995 la première séquence complète de l'ADN d'un organisme vivant, la bactérie *Haemophilus influenzae*. Ils ont déchiffré la séquence entière de ce génome de 1,9 mégabases !

Message Un fragment d'ADN cloné peut être séquencé par deux méthodes différentes qui fournissent des collections de molécules marquées d'ADN à simple brin différant entre elles par un nucléotide. Ces molécules sont séparées par électrophorèse sur gel, le gel est autoradiographié et le profil de bandes obtenu fournit la séquence de l'ADN.

Dans certains cas, la localisation précise d'un gène dans un fragment cloné n'est pas connue et la séquence peut être utile pour trouver le gène. La séquence du fragment est introduite dans un ordinateur qui balaye les six cadres de lecture ouverts (trois dans chaque direction) en cherchant un segment d'ADN de la taille d'un gène commençant par un ATG et se terminant par un codon stop. La figure 14-28 montre une analyse qui a permis l'identification de deux longs **cadres de lecture ouverts** (open reading frame ou **ORF**) correspondant à deux gènes présumés. Il est intéressant de noter ici que l'analyse des ORF et la génétique mendélienne sont, par des approches très différentes, deux façons d'identifier des gènes.

BCU IAST / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

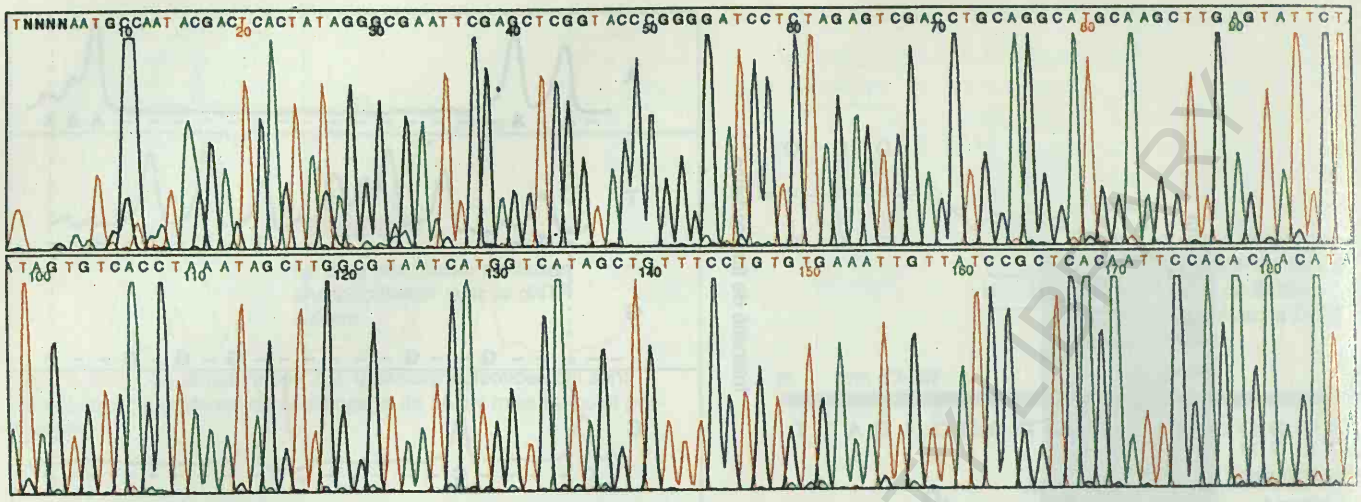


Figure 14-27. Données fournies par un séquenceur automatique utilisant des colorants fluorescents. N représente une base qui ne peut pas être identifiée.

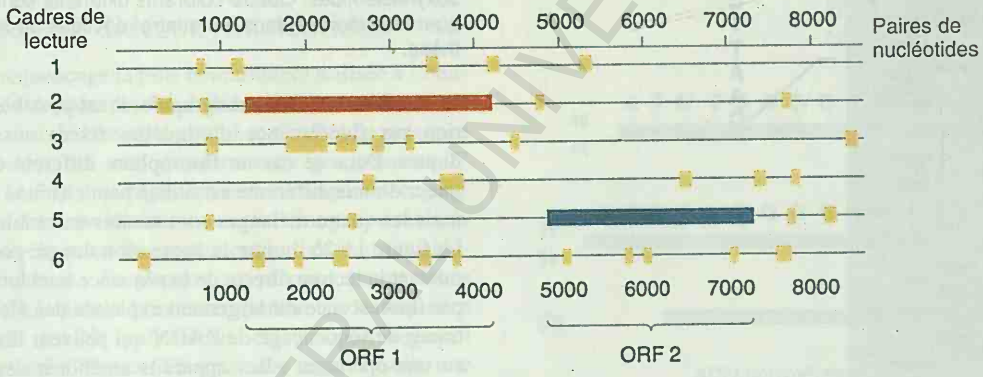


Figure 14-28. Tout fragment d'ADN contient six cadres de lecture ouverts (open reading frame ou ORF) potentiels, trois dans chaque direction. Ici l'ordinateur a balayé la séquence d'un plasmide fongique de 9 kb en recherchant les ORF (les gènes potentiels). Deux longs cadres de lecture ouverts (ORF 1 et 2) sont les gènes potentiels les plus vraisemblables.

La réaction de polymérisation en chaîne

Si une région d'ADN a déjà été clonée et séquencée, on peut se servir de cette séquence pour recouvrer des parties de la région équivalente d'autres organismes dans une population, et ce sans avoir à cloner. Ce type d'analyse est important pour l'étude des variations de cette séquence chez certains individus spécifiques—par exemple pour détecter certaines mutations. L'analyse repose sur une technique appelée la **réaction de polymérisation en chaîne** ou **PCR** (pour polymerase chain reaction). La figure 14-29 montre son principe. Une polymérase thermostable de la bactérie *Thermus aquaticus*, la *Taq* polymérase est utilisée pour catalyser la croissance de la chaîne à partir d'amorces d'ADN. Les amorces correspondant à des des brins opposés sont allongées dans des directions différentes, c'est-à-dire dans la direction l'une de l'autre comme le montre la figure 14-29. Lorsque la réplication du segment compris entre les deux amorces est terminée (un cycle), les deux duplex formés sont dénaturés par la chaleur pour produire des matrices monocaténaires et un second cycle de réplication est effectué en abaissant la température en présence de tous les composants requis pour la polymérisation. La répétition des cycles de synthèse et de dénaturation entraîne un accroissement géométrique du nombre de fragments répliqués. Des amplifications de l'ordre d'un million de fois peuvent ainsi être aisément réalisées. Une copie unique d'un gène humain peut être détectée par amplification au PCR pour autant que des amorces correspondant à des séquences connues du gène soient disponibles.

La PCR a trouvé de nombreuses applications en génétique moléculaire, toutes basées sur son aptitude à amplifier à volonté des segments d'ADN spécifiques. Aucune digestion de l'ADN servant de substrat n'est nécessaire puisque les amorces vont se loger au niveau des séquences appropriées de l'ADN natif. De plus, aucune fastidieuse opération de clonage n'est requise puisque suffisamment d'ADN est amplifié pour qu'une bande très visible sur

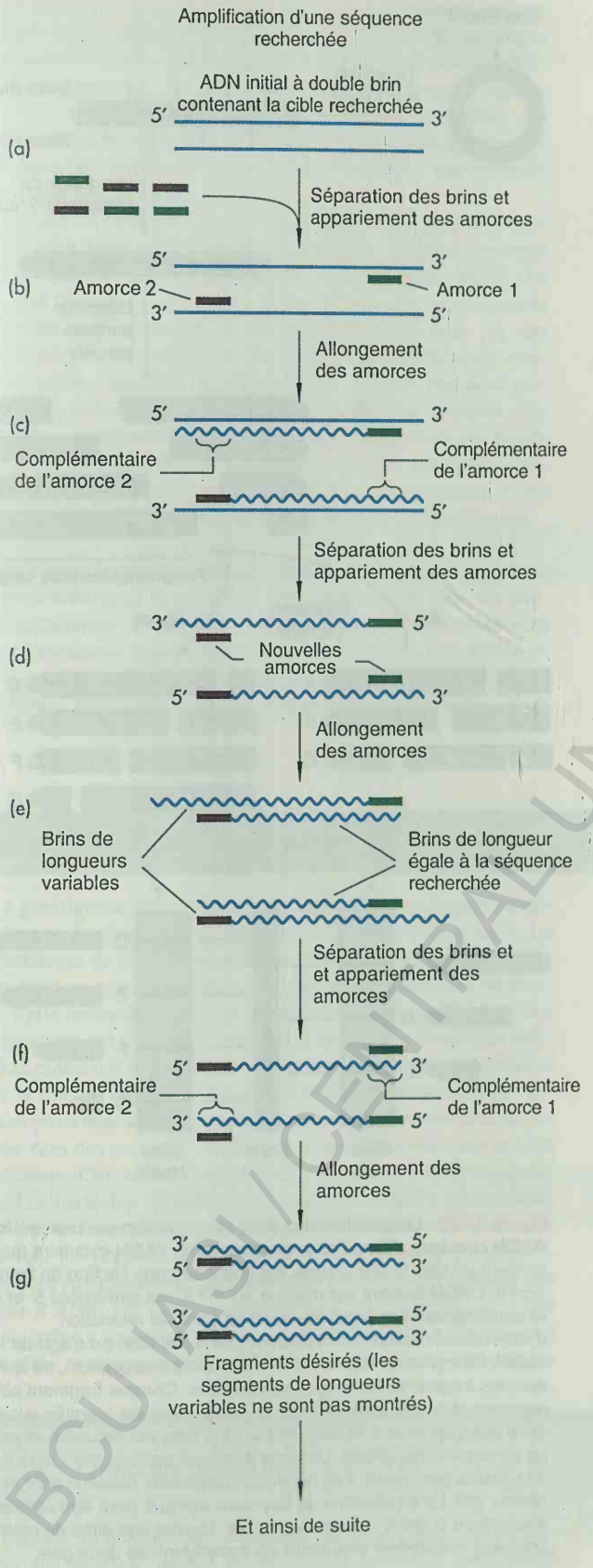


Figure 14-29. La réaction de polymérisation en chaîne. (a) Un ADN à double brin comprenant la séquence recherchée. (b) Deux amorces, dont les séquences sont complémentaires de sites de liaison situés aux extrémités 3' de la séquence recherchée sur les deux brins, sont choisies ou synthétisées. Les brins sont séparés par chauffage, de manière à permettre aux amorces de s'apparier à leurs sites de liaison complémentaires. Les amorces flanquent par conséquent la séquence recherchée. (c) La *Taq* polymérase synthétise une première paire de brins complémentaires. Ces deux brins ont des longueurs variables puisqu'ils ne comportent pas de signaux de terminaison communs. Ils s'étendent au-delà de la séquence cible définie par les sites de liaison des amorces. (d) Les duplex obtenus sont dénaturés et exposent quatre sites de liaison. (Pour la simplicité, seuls les nouveaux brins sont montrés). Les deux amorces se lient à nouveau à leurs séquences complémentaires aux extrémités de la séquence cible. (e) La *Taq* polymérase synthétise à nouveau deux brins complémentaires. Bien que les brins servant de matrice soient de longueurs variables à ce stade, les deux brins synthétisés qui leur sont complémentaires ont précisément la longueur de la séquence cherchée. Ceci provient de ce que chaque nouveau brin commence au site de liaison de l'amorce, *à l'une des extrémités de la séquence cible* , et se prolonge jusqu'à ce que la matrice fasse défaut, *à l'autre extrémité de la séquence.* (f) Chaque nouveau brin débute par une séquence amorce et se termine par la séquence complémentaire de l'autre amorce. Après la séparation des brins, les amorces s'apparient à nouveau et les brins sont prolongés jusqu'à la longueur de la séquence désirée. (Le brin de longueur variable du point (c) contribue également à la formation de brins de la longueur voulue). (g) La technique peut être répétée indéfiniment, chaque cycle créant deux molécules d'ADN à double brin identiques à la séquence cible. (D'après J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *ADN Recombinant,* 1ière éd. par De Boeck-Wesmael, S.A.)

un gel soit obtenue. Enfin, de très petites quantités d'ADN sont requises comme substrat ; des segments d'ADN humain peuvent par exemple être amplifiés à partir de quelques cellules folliculaires arrachées avec un seul cheveu. La PCR est en général utile dans les diagnostics basés sur l'ADN, c'est-à-dire pour vérifier le statut mutationnel d'un gène ou d'une partie de gène.

Message La réaction de polymérisation en chaîne utilise des amorces spécialement conçues pour amplifier, sans clonage, de petites régions d'ADN spécifiques.

Les cartes de restriction

Nous avons déjà vu l'importance des enzymes de restriction pour la coupure de l'ADN en vue du clonage. Une autre caractéristique utile des enzymes de restriction est que les positions de leurs sites d'action le long d'une molécule d'ADN (c'est-à-dire le long d'un chromosome) peuvent servir de marqueurs. Bien que les positions de ces sites soient aléatoires, ils existent en général à la même position sur des chromosomes homologues. C'est pourquoi ces sites peuvent jouer le même rôle que les bornes kilométriques le long des routes et, sans être importants par eux-mêmes, servir de points de références pour la localisation d'éléments plus essentiels. Une carte des positions des sites de restriction est donc en général

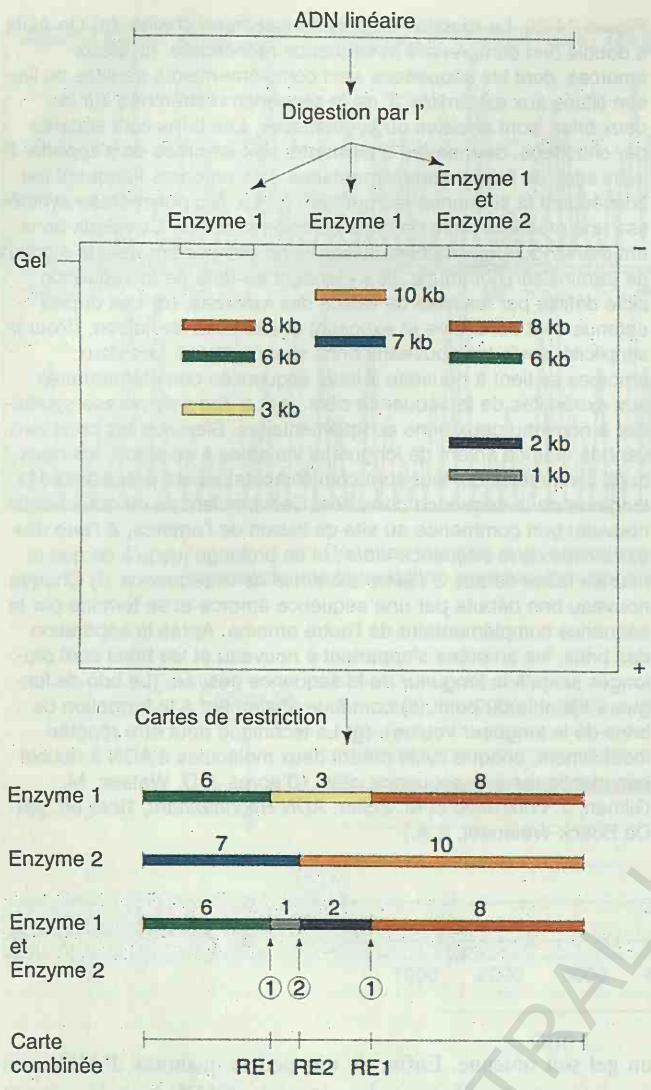


Figure 14-30. Cartographie de restriction basée sur la comparaison des profils électophorétiques obtenus après des digestions simples et multiples. Dans cet exemple simplifié, la digestion par l'enzyme 1 montre qu'il existe deux sites de coupure par cette enzyme mais n'indique pas si le segment de 3 kb provient du milieu ou d'une des extrémités de la séquence digérée qui est longue de 17 kb. La digestion par le mélange des enzymes 1 et 2 laisse intacts les segments de 6 et 8 kb mais coupe le fragment de 3 kb, montrant que l'enzyme 2 coupe à un site compris dans ce fragment produit par l'enzyme 1. Si le segment de 3 kb se trouvait à l'extérieur de la séquence étudiée, la digestion par l'enzyme 2 seule fournirait un fragment d'1 ou 2 kb. Puisque ce n'est pas le cas, seul parmi les trois fragments obtenus par l'action de l'enzyme 1, le fragment de 3 kb doit se trouver au milieu. Le fait que des fragments de 7 et 10 kb soient produits lors de la digestion par l'enzyme 2 indique que le site RE2 est plus proche de la coupure qui produit le segment de 6 kb que de celle qui produit le fragment de 8 kb.

un outil précieux pour l'analyse des génomes. Le plus souvent, une carte de restriction est établie pour une région limitée d'un chromosome qui est d'un intérêt particulier ou pour un relativement petit chromosome comme un plasmide ou le génome d'un organite.

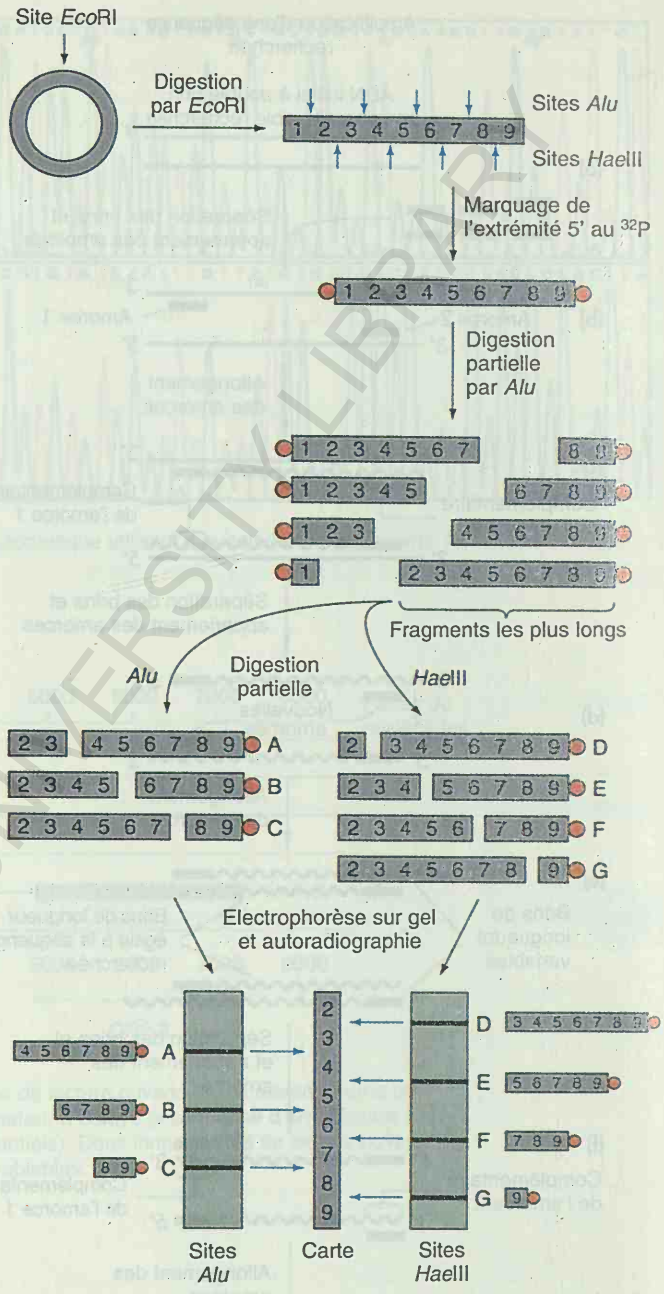


Figure 14-31. Localisation des sites de restriction sur une molécule d'ADN circulaire. Dans l'exemple considéré, l'ADN circulaire qui contient un site *Eco*RI unique, est linéarisé sous l'action de l'enzyme *Eco*RI. L'ADN linéaire est marqué au ^{32}P à ses extrémités 5' et digéré partiellement par l'enzyme *Alu* (l'enzyme de restriction d'*Arthrobacter luteus,* mais il aurait tout aussi bien pu s'agir de *Hae*III, l'enzyme de restriction d'*Haemophilus aegyptius*), ce qui produit des fragments de longueurs variables. Chaque fragment obtenu est marqué à une seule extrémité. Après avoir été identifié sur un gel d'électrophorèse, le fragment le plus long est récupéré et partagé en deux échantillons. Un échantillon est partiellement digéré par *Alu*, l'autre par *Hae*III. Les nouveaux fragments obtenus sont séparés sur gel. La localisation du fragment marqué peut être établie en soumettant le gel à l'autoradiographie. L'ordre des sites de restriction peut maintenant être établi en comparant les deux gels.

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Une manière de dresser une carte de restriction est de comparer des digestions simples et doubles. Deux enzymes de restriction sont d'abord engagées dans des digestions séparées et sont ensuite utilisées ensemble. La taille des fragments obtenus est ensuite déterminée par électrophorèse. La comparaison des tailles des fragments produits au cours des différentes digestions permet une localisation approximative des sites de restriction. Cette méthode est illustrée dans la figure 14-30.

La figure 14-31 montre une autre manière de dresser une carte de restriction. Dans cette méthode, un fragment d'ADN est marqué au ^{32}P à chacune de ses extrémités 5' et coupé pour obtenir des fragments marqués à une seule extrémité. Le plus long fragment obtenu est isolé et soumis à une digestion incomplète par une seconde enzyme de restriction ; une population de fragments marqués de tailles variables est ainsi produite, chaque fragment portant un des sites de restriction à son extrémité non marquée. Ces fragments sont séparés par électrophorèse et la distance qui sépare chaque site de restriction de l'extrémité marquée est déterminée. La figure 14-32 présente un exemple de carte de restriction. Cette carte est celle de l'ADN du plasmide linéaire d'un champignon.

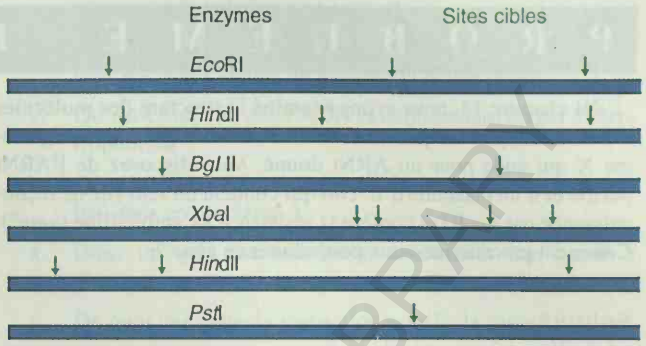


Figure 14-32. Carte de restriction d'un plasmide linéaire fongique montrant les sites de restriction pour six enzymes différentes.

Nous avons introduit dans ce chapitre les techniques de base qui ont révolutionné la génétique. Les gènes ne sont plus des entités hypothétiques. Grâce à la technologie de l'ADN recombinant et aux techniques apparentées, les gènes peuvent être isolés en tube à essai et caractérisés comme des séquences nucléotidiques spécifiques. Mais ceci n'est pas encore la fin de l'histoire. Nous verrons au chapitre suivant que le fait de connaître une séquence est souvent le point de départ d'une nouvelle série de manipulations génétiques impliquant des techniques de pointe pour modifier le phénotype d'un organisme.

R É S U M É

La génétique se focalise sur l'étude des gènes et a pour principal objectif de déterminer la structure et la fonction de ceux-ci. La méthodologie de l'ADN recombinant a permis d'isoler des gènes individuels en tube à essai et de les caractériser au niveau moléculaire. Cette technologie est essentiellement centrée sur les enzymes de restriction qui coupent l'ADN pour former des fragments définis. Les cibles des enzymes de restriction peuvent être localisées et jouer le rôle de repères le long de l'ADN. Les fragments de restriction possèdent souvent des bouts collants qui permettent de les insérer dans des vecteurs capables de se répliquer dans une cellule bactérienne. Ces molécules hybrides constituent l'*ADN recombinant*. Les bactéries amplifient une molécule d'ADN recombinant unique pour former un clone d'ADN. Les vecteurs les plus courants sont les plasmides, les phages et les cosmides. Un génome entier peut être cloné dans une collection de clones qui forment une *banque d'ADN*. Un clone spécifique peut être identifié dans une banque grâce à une sonde qui se lie spécifiquement à l'ADN ou à la protéine correspondant au clone désiré. Des clones spécifiques peuvent aussi être identifiés par leur capacité à transformer des mutants nuls. L'étiquetage est également utile pour cloner un gène : on se sert de l'ADN transformant ou des transposons pour provoquer des mutations par insertion et l'ADN adjacent de ces étiquettes est isolé. La marche sur le chromosome fournit un moyen d'isoler un gène par l'isolement séquentiel de clones chevauchants, en partant d'un marqueur lié au gène désiré. L'ADN cloné peut être séquencé à l'aide de diverses méthodes dont notamment l'arrêt de la croissance de la chaîne d'ADN par les didésoxynucléotides. La réaction de polymérisation en chaîne emploie des amorces pour amplifier des séquences d'ADN. C'est un moyen d'isoler rapidement des ADN dont la structure est déjà partiellement connue et de détecter de très petites quantités d'ADN spécifique. L'électrophorèse sur gel sépare des mélanges de molécules d'ADN et d'ARN sur base de leur taille. On se sert de sondes pour détecter des molécules d'ADN ou d'ARN spécifiques à l'aide de techniques appelées respectivement *transferts de Southern et de Northern*.

Diagramme conceptuel

Dressez un diagramme conceptuel liant autant des termes suivants que possible. Notez qu'ils ne sont présentés dans aucun ordre particulier.

enzyme de restriction / ADN recombinant / clone d'ADN / sonde / transformation / vecteur / complémentation / séquençage / banque

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Au chapitre 13, nous avons examiné la structure des molécules d'ARNt. Supposons que vous désiriez cloner le gène d'un organisme X qui code pour un ARNt donné. Vous disposez de l'ARNt purifié et d'un plasmide d'*E. coli* qui contient un seul site de reconnaissance par *Eco*RI et confère la résistance à l'ampicilline (amp^R). Comment procéderiez-vous pour cloner ce gène ?

Solution

Vous pouvez utiliser l'ARNt lui-même comme sonde pour repérer l'ADN portant ce gène. Une méthode consiste à digérer l'ADN de l'organisme X avec *Eco*RI et à insérer cet ADN dans le plasmide que vous avez lui-même coupé avec *Eco*RI. Après transformation d'un récepteur amp^S tet^S, des colonies Amp^R, indices de transformations réussies, sont sélectionnées. Parmi celles-ci, sélectionnez les colonies Tet^S. Elles contiennent des vecteurs porteurs d'inserts et il en faut un grand nombre pour faire une banque. La banque est ensuite testée en utilisant l'ARNt comme sonde. Vous pouvez compléter l'examen des colonies qui s'hybrident avec la sonde pour déterminer quelle portion de la séquence de l'ARNt elles contiennent.

Vous pouvez aussi séparer l'ADN de l'organisme X digéré par *Eco*RI sur un gel d'électrophorèse et identifier le fragment correct en utilisant l'ARNt pour sonde. Ce fragment peut être enlevé du gel et servir de source d'ADN enrichi à insérer dans le plasmide coupé par *Eco*RI.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. L'enzyme de restriction *Hin*dIII coupe l'ADN au niveau de la séquence AAGCTT et l'enzyme *Hpa*II le coupe au niveau de la séquence CCGG. Quelle est la fréquence moyenne à laquelle chacune de ces enzymes coupe un ADN à double brin ? (En d'autres termes, quelle est la distance moyenne entre deux sites de restriction de chaque type ?)

Solution

Nous n'avons à prendre en considération qu'un des brins d'ADN puisque, en raison de la symétrie du site de reconnaissance, les deux séquences qui nous concernent seront présentes au même endroit sur les brins complémentaires. La fréquence d'apparition d'une séquence *Hin*dIII de six bases est en théorie de $1/4^6 = 1/4096$, puisqu'il y a quatre possibilités pour chacune des six positions du site. La distance moyenne entre deux sites *Hin*dIII est donc d'environ 4 kb. Pour *Hpa*II, la fréquence d'apparition de la séquence de quatre bases reconnue par l'enzyme est de $1/4^4$ ou 1/256. La distance moyenne entre deux sites *Hpa*II est d'environ 0,25 kb.

2. A partir du tableau 14-1, déterminez lequel des enzymes *Eco*RI et *Sma*I conviendrait le mieux pour une tentative de clonage. Justifiez votre réponse.

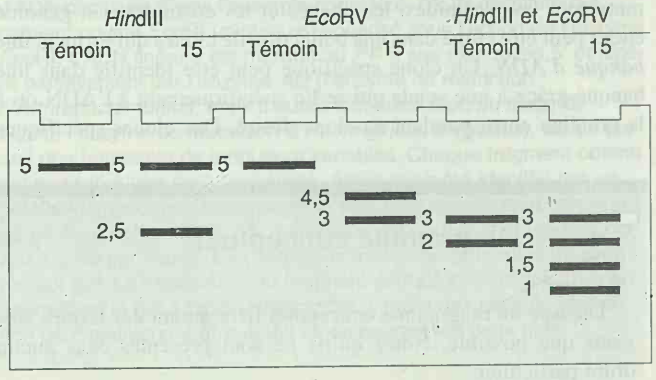
Solution

Ces deux enzymes de restriction reconnaissent un site de six paires de bases ; on doit donc s'attendre à trouver le même nombre de site de reconnaissance par génome pour les deux enzymes. La principale différence entre les deux enzymes est que *Eco*RI produit des coupures décalées tandis que *Sma*I crée des bouts francs. Les extrémités cohésives sont beaucoup plus faciles à manipuler pour le clonage étant donné les possibilités d'appariement qu'elles offrent.

(Solution de Diane K. Lavett)

PROBLÈMES

1. Un plasmide bactérien circulaire (pBP1) possède un unique site de restriction pour l'enzyme *Hin*dIII au milieu d'un gène de résistance à la tetracycline (tet^R). L'ADN génomique de la mouche du vinaigre est digéré avec *Hin*dIII et une banque dans pBP1 est construite. L'utilisation d'une sonde montre que le clone 15 contient le gène de *Drosophila* recherché. Le clone 15 est soumis à une analyse par restriction par *Hin*dIII et par une autre enzyme de restriction, *Eco*RV. Le gel d'électrophorèse coloré au bromure d'éthidium présente les bandes montrées dans le diagramme ci-joint (le témoin est un plasmide pBP1 sans insert). Les tailles des bandes (en kilobases) sont indiquées à leur gauche. (NOTE : Les molécules circulaires ne fournissent pas des bandes de forte intensité dans ce type de gel ; vous pouvez donc supposer que toute les bandes représentent des molécules linéaires.)



a. Dressez des cartes de restriction du plasmide pBP1 avec et sans insert, en montrant les sites des séquences cibles et la position approximative du gène tet^R.

b. Si le même gène tet^R cloné dans un vecteur totalement non homologue est marqué radioactivement et utilisé comme sonde pour un transfert de Southern de ce gel, quelles bandes vous attendez-vous à voir apparaître radioactives sur un autoradiogramme ?

c. Si le gène équivalent d'une mouche étroitement apparentée à *Drosophila* a été cloné dans un vecteur non homologue et est utilisé comme sonde pour le même gel, quelles bandes vous attendez-vous à voir sur l'autoradiogramme.

Décomposons le problème

a. Que sont les plasmides et à quoi servent-ils dans la technologie de l'ADN recombinant ?

b. Où pourriez-vous découvrir un plasmide bactérien tout à fait nouveau ?

c. Faites un schéma simple du plasmide pBP1 montrant le gène tet^R.

d. Pourquoi les plasmides portent-t-ils des gènes de résistance aux antbiotiques ?

e. Que fait une enzyme de restriction et en quoi est-ce utile pour la technologie de l'ADN recombinant ?

f. Pourquoi est-il important que le plasmide pBP1 ne contienne qu'un seul site *Hin*dIII ?

g. Pourquoi est-il utile que le plasmide pBP1 possède un seul site *Hin*dIII à l'intérieur du gène tet^R ?

h. Quel effet attend-on de la coupure de pBP1 par *Hin*dIII ?

i. Existe-t-il un argument expérimental qui indique que pBP1 ne possède qu'un seul site *Hin*dIII ?

j. Expliquez brièvement comment la banque a été construite.

k. Expliquez brièvement comment la sonde utilisée pour trouver le gène cherché a été construite.

l. En quoi le clone 15 est-il différent de tous les autres clones ?

m. Comment croyez-vous que l'ADN génomique de *Drosophila* a été obtenu ?

n. Quelle différence fonctionnelle il y a-t il entre les enzymes de restriction ?

o. Expliquez de manière précise pouquoi le bromure d'éthidium est nécessaire dans cette expérience.

p. Voyez si vous trouvez d'autres références au bromure d'éthidium dans ce livre et comparez ses diverses utilisations.

q. Comment le transfert de Southern a-t-il été réalisé ?

r. Comment l'autoradiographie a-t-elle été réalisée ?

s. Que représentent les taches observées sur un autoradiogramme ?

t. Comparez l'emploi du mot marqué dans ce problème avec son usage dans le langage courant.

u. Qu'est-ce qu'une kilobase ? Que mesure-elle ? Quelles sont les autres façons de mesurer la même chose ?

v. Qu'est-ce qui fait que l'ADN se déplace dans un gel d'électrophorèse ?

w. Que signifie *non homologue* dans le sens où ce mot est utilisé dans ce problème ?

x. Dans un gel, que représente exactement une bande ? Comment pourriez-vous prouver ce que vous dites ?

y. De quoi une carte de restriction est-elle la carte ?

z. Que représente le nombre total de kilobases dans chaque piste ? Quel type d'uniformité devrait-on voir dans les différentes pistes ?

aa. Pourquoi il y a-t-il plus de bandes dans la double digestion que dans la simple ?

bb Lorsque l'ADN du donneur est inséré à un site de restriction, de nouveaux sites de restrictions sont-ils créés ?

cc. Lorsque vous voyez des bandes de la même taille dans des pistes différentes, cela signifie-t-il qu'il s'agit du même fragment d'ADN ? Pouvez-vous trouver dans ce problème un exemple qui soit en rapport avec ce point ?

dd. Quelle relation il y a-t-il entre le nombre de bandes produites et le nombre de sites de restriction présents dans une molécule circulaire ?

2. L'enzyme de restriction *Eco*RI coupe l'ADN au niveau de la séquence GAATTC et l'enzyme *Hae*III le coupe au niveau de la séquence GGCC. Quelle est la fréquence moyenne à laquelle chacune de ces enzymes coupe un ADN à double brin ? (En d'autres termes, quelle est la distance moyenne entre deux sites de restriction de chaque type ?)

3. Le génome du bactériophage ϕX174 est constitué d'un ADN monocaténaire. Lorsqu'il infecte une bactérie, le phage synthétise un brin complémentaire du brin infectieux en produisant une forme réplicative circulaire à double brin (RF). Proposez un protocole expérimental pour déterminer si la transcription se fait sur les deux brins ou sur un seul brin de la double hélice RF.

4. Vous avez purifié de l'ADN et vous désirez localiser les sites de restriction sur cet ADN. Après digestion par *Eco*RI, vous obtenez les fragments 1, 2, 3 et 4. Après digestion de chacun de ces fragments par *Hin*dII, vous constatez que le fragment 3 donne deux sous-fragments (3_1 et 3_2) et que le fragment 2 en donne trois (2_1, 2_2 et 2_3). Après digestion de la molécule entière par *Hin*dII, vous récupérez quatre fragments : A, B, C et D. Lorsque ces fragments sont traités par *Eco*RI, le fragment D produit les fragments 1 et 3_1, le fragment A produit 3_2 et 2_1 et le fragment B produit 2_3 et 4. Le fragment C est identique à 2_2. Dessinez la carte de restriction de ce segment d'ADN.

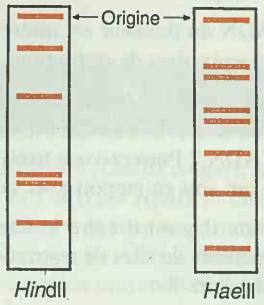
5. Des fragments d'ADN de *Drosophila* obtenus par traitement avec une enzyme de restriction sont insérés dans des plasmides et sélectionnés sous forme de clones dans *E. coli*. C'est en utilisant cette technique de «clonage à l'aveugle» que David Hogness a récupéré toutes les séquences de l'ADN de *Drosophila* dans une banque.

BOJAS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a. Comment procéderiez-vous pour retrouver dans cette banque le clone qui contient l'ADN codant pour la protéine actine ?

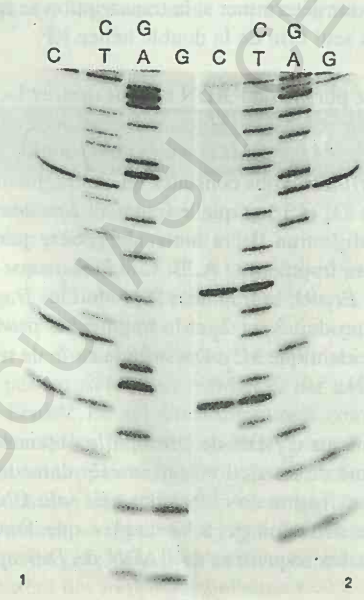
b. Comment procéderiez-vous pour identifier un gène codant pour un ARNt particulier ?

6. Vous avez isolé et cloné un segment d'ADN dont on sait qu'il représente une séquence unique du génome. Il est localisé à l'extrémité du chromosome X et mesure environ 10 kb. Vous marquez les extrémités 5' de ce fragment au ^{32}P et coupez la molécule avec *Eco*RI. Vous obtenez deux fragments, l'un de 8,5 kb, l'autre de 1,5 kb. Vous partagez le fragment de 8,5 kb en deux fractions et faites une digestion partielle de l'une par *Hae*III et de l'autre par *Hin*dII. Vous séparez ensuite les mélanges obtenus sur un gel d'agarose. Par autoradiographie, vous obtenez les résultats ci-dessous :



Dessinez la carte de restriction de la molécule complète de 10 kb.

7. Comme le montre le haut de l'autoradiographie ci-dessous, la méthode de Maxam-Gilbert a été utilisée pour déterminer la séquence de deux fragments d'ADN du locus du type conjuguant *a* de la levure. Les bases indiquées en haut du gel sont celles qui sont attaquées par le réactif. Quels sont les séquences nucléotidiques de ces deux fragments ?



8. Imaginez un protocole expérimental qui vous permette de purifier des séquences d'ADN localisées sur le chromosome Y.

9. Calculez la distance moyenne (en paires de nucléotides) séparant les sites de restriction de l'organisme X pour les enzymes de restriction suivantes :

*Alu*I	5' AGCT 3'
	3' TCGA 5'
*Eco*RI	5' GAATTC 3'
	3' CTTAAG 5'
*Acy*I	5' G Pu CG Py C 3'
	3' C Py GC Pu G 5'

(NOTE : Py = une pyrimidine ; Pu = une purine)

10. Un fragment d'ADN linéaire est coupé d'une part par *Hin*dIII, d'autre part par *Sma*I, puis par les deux enzymes ensemble. Les fragments obtenus sont les suivants ;

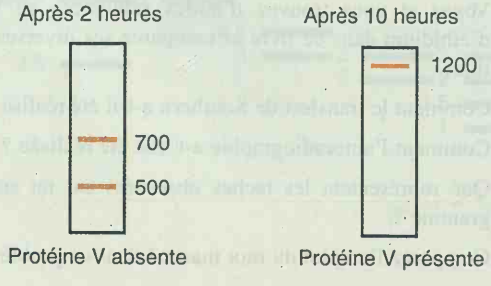
*Hin*dIII	2,5 kb, 5,0 kb
*Sma*I	2,0 kb, 5,5 kb
*Hin*dIII et *Sma*I	2,5 kb, 3,0 kb, 2,0 kb

a. Dessinez la carte de restriction.

b. Le mélange des fragments produits par la combinaison des deux enzymes est ensuite digéré par *Eco*RI. Ceci fait disparaître le fragment de 3 kb (en d'autres termes une bande colorée au bromure d'éthidium sur un gel d'agarose) et fait apparaître une bande colorée correspondant à un fragment de 1,5 kb. Portez le site *Eco*RI sur la carte.

(Problème 10 présenté grâce à l'amabilité de Joan McPherson. De A. J F. Griffiths et J. McPherson, *100+Principles of Genetics*. W. H. Freeman and Company, 1989.)

11. Un fragment d'ADN viral contenant le gène *V* est transfecté (introduit dans la cellule par transformation) dans une culture de cellules de muscles. Après incubation des cellules avec des ribonucléotides marqués au ^{32}P, les ARN viraux sont isolés après deux intervalles de temps. Ces ARN marqués sont traités de la manière suivante. Ils sont d'abord hybridés avec un ADNc construit à partir des ARN matures du gène viral *V*. L'hybride est ensuite traité à la RNase, dénaturé et soumis à une électrophorèse sur gel. Le gel est soumis à l'autoradiographie. Le résultat, illustré ci-dessous, suggère que les effets pathologiques du virus sont liés au temps (la taille de chaque bande est indiquée en nombre de nucléotides) :



BCU LAUSANNE CENTRALE UNIVERSITY LIBRARY

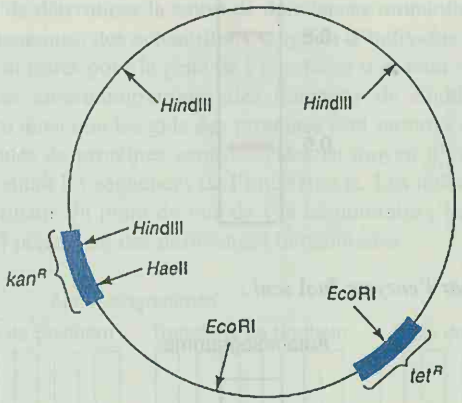
a. Quelle est la taille de l'ARNm mature du gène *V* ?

b. Faites un schéma de chacun des hybrides et indiquez ce que représentent les bandes illustrées.

c. Pourquoi la protéine V n'est-elle pas produite avant deux heures ?

(Problème 11 présenté grâce à l'amabilité de Joan McPherson. De A. J F. Griffiths et J. McPherson, *100+Principles of Genetics*. W. H. Freeman and Company, 1989.)

12. Le gène de la β-tubuline de *Neurospora* a été cloné et est disponible. Imaginez étape par étape un protocole expérimental permettant d'isoler le gène correspondant du champignon apparenté *Podospora* en utilisant comme vecteur le plasmide pBR322 d'*E. coli* qui est décrit ci-dessous, où kan = kanamycine et tet = tétracycline.



13. Un plasmide circulaire bactérien contenant un gène de résistance à la tétracycline est coupé par l'enzyme de restriction *Bgl*II. L'électrophorèse montre une bande de 14 kb.

a. Que peut-on déduire de ce résultat ?

Le plasmide est coupé par *EcoRV* et l'électrophorèse produit deux bandes, de 2,5 kb et 11,5 kb.

b. Que peut-on déduire de ce résultat ?

La digestion par les deux enzymes ensemble fournit trois bandes, de 2,5 kb, 5,5 kb et 6 kb.

c. Que peut-on déduire de ce résultat ?

L'ADN du plasmide coupé par *Bgl*II est mélangé et ligaturé avec des fragments de l'ADN du donneur également coupé par *Bgl*II pour former des molécules d'ADN recombinant. Tous les clones recombinants se montrent sensibles à la tétracycline.

d. Que peut-on déduire de ce résultat ?

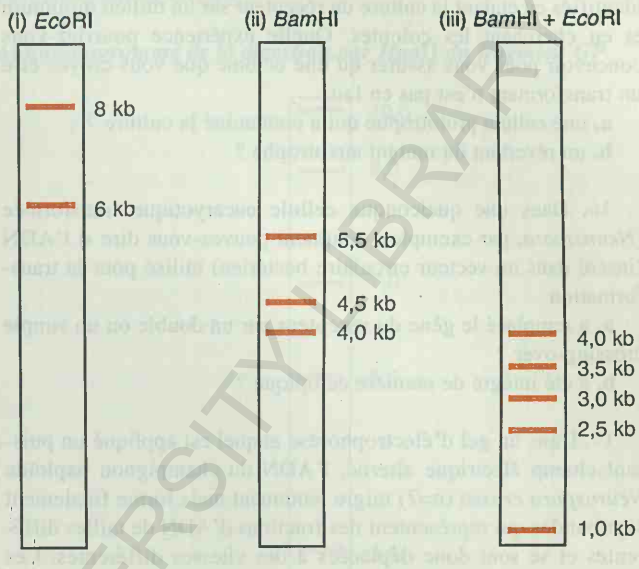
Un recombinant est coupé par *Bgl*II et des fragments de 4 kb et de 14 kb sont obtenus.

e. Expliquez ce résultat.

Le même clone est traité par *Eco*RV et des fragments de 2,5 kb, 7 kb et 8,5 kb sont observés.

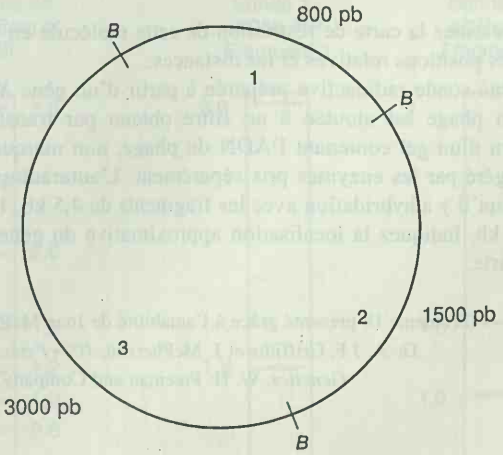
f. Expliquez ces résultats en dressant un carte de restriction de l'ADN recombinant.

14. **a.** Un fragment d'ADN de souris contenant le gène *M* a été obtenu par restriction à l'aide d'*Eco*RI (qui produit des bouts collants). Ce fragment qui mesure 8 kb est inséré au site *Eco*RI du plasmide bactérien pBR322. Le plasmide recombinant est coupé par trois enzymes de restriction. Les profils de bandes obtenus après électrophorèse sur gel et coloration au bromure d'éthidium sont décrits dans la figure ci-dessous :



Un transfert de Southern du gel (iii) est effectué et suivi d'une hybridation. Quels sont les fragments qui s'hybrideront avec une sonde marquée constituée d'ADN de pBR322 ?

b. Le gène *X* est porté par un plasmide qui est constitué de 5300 paires de bases (5300 pb). Lorsque le plasmide est coupé par l'enzyme de restriction *Bam*HI, il fournit les fragments 1, 2 et 3 comme le montre le diagramme présenté ci-dessous (*B* = sites de restriction par *Bam*HI). L'un des fragments *Bam*HI contient plusieurs copies du gène *X* disposées en tandem. En supposant que le gène *X* code pour une protéine X de 400 acides aminés, indiquez la position approximative et les orientations des copies du gène *X*.



(Problème 14 présenté grâce à l'amabilité de Joan McPherson. De A. J F. Griffiths et J. McPherson, *100+Principles of Genetics*. W. H. Freeman and Company, 1989.)

15. Dans la complémentation de fonction, chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, la prototrophie est souvent le phénotype sélectionné pour détecter les transformants. Des cellules pro-

DUKE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

totrophes servent de source pour l'extraction de l'ADN du donneur, cet ADN est cloné et les clones introduits dans une culture d'un récepteur auxotrophe. Les transformants prototrophes sont identifiés en étalant la culture du récepteur sur un milieu minimum et en cherchant les colonies. Quelle expérience pourriez-vous concevoir pour vous assurer qu'une colonie que vous croyez être un transformant n'est pas en fait,

a. une cellule prototrophe qui a contaminé la culture ?

b. un révertant du mutant auxotrophe ?

16. Dans une quelconque cellule eucaryotique transformée (*Neurospora*, par exemple), comment pouvez-vous dire si l'ADN (inséré dans un vecteur circulaire bactérien) utilisé pour la transformation

a. a remplacé le gène du récepteur par un double ou un simple crossing-over ?

b. a été intégré de manière ectopique ?

17. Dans un gel d'électrophorèse auquel est appliqué un puissant champ électrique alterné, l'ADN du champignon haploïde *Neurospora crassa* (n=7) migre lentement mais forme finalement sept bandes qui représentent des fractions d'ADN de tailles différentes et se sont donc déplacées à des vitesses différentes. Ces bandes sont présumées être les sept chromosomes. Comment pourriez-vous montrer à quel chromosome correspond chaque bande ?

18. Un chromosome linéaire de phage est marqué au ^{32}P à ses deux extrémités et digéré par des enzymes de restriction. L'enzyme *Eco*RI produit des fragments de 2,9 kb, 4,5 kb, 6,2 kb, 7,4 kb et 8 kb. Une autoradiographie d'un transfert à la Southern du gel contenant ces fragments montre que la radioactivité est associée aux fragments de 6,2 kb et de 8 kb. L'enzyme *Bam*HI coupe le même ADN en fragments de 6,0 kb, 10,1 kb et 12,9 kb. Dans ce cas, le marquage est associé aux fragments de 6,0 kb et de 10,1 kb. Lorsque *Eco*RI et *Bam*HI sont utilisés ensemble les fragments obtenus mesurent 1,0 kb, 2,0 kb, 2,9 kb, 3,5 kb, 6,0 kb, 6,2 kb et 7,4 kb.

a. Dessinez la carte de restriction de cette molécule en y indiquant les positions relatives et les distances.

b. Une sonde radioactive préparée à partir d'un gène *X* cloné dans un phage est ajoutée à un filtre obtenu par transfert de Southern d'un gel contenant l'ADN du phage, non marqué cette fois, digéré par les enzymes pris séparément. L'autoradiographie montre qu'il y a hybridation avec les fragments de 4,5 kb, 10,1 kb et 12,9 kb. Indiquez la localisation approximative du gène *X* sur votre carte.

(Problème 18 présenté grâce à l'amabilité de Joan McPherson. De A. J F. Griffiths et J. McPherson, *100+Principles of Genetics*. W. H. Freeman and Company, 1989.)

19. Le clone d'ADNc et le clone génomique d'une phosphatase ont été isolés. Les caractéristiques structurales du gène et de son transcrit peuvent être déterminées à partir des données suivantes :

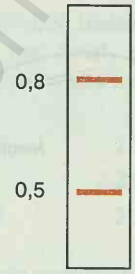
Carte de l'ADNc

Le fragment d'ADNc a été excisé d'un plasmide et ses extrémités ont été marquées au ^{32}P.

*Digestion combinée par les enzymes Hae*III *et Taq*I

Fragments séparés par électrophorèse et colorés au bromure d'éthidium :

Autoradiographie du gel obtenu après la digestion combinée :



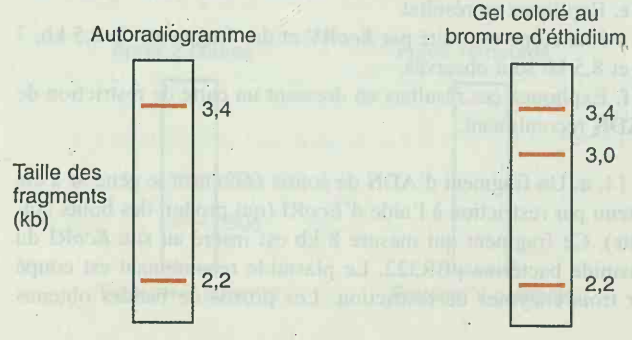
*Digestion par l'enzyme Taq*I *seul :*

a. Dresser la carte de l'ADNc.

Carte de l'ADN génomique

Le fragment d'ADN génomique a été excisé d'un clone dans le phage λ par l'enzyme *Eco*RI et ses caractéristiques de restriction déterminées. Le fragment a été marqué à ses extrémités et digéré.

*Digestion complète par Bam*HI



CUASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

b. Dressez une carte du génome en indiquant les sites de restriction.

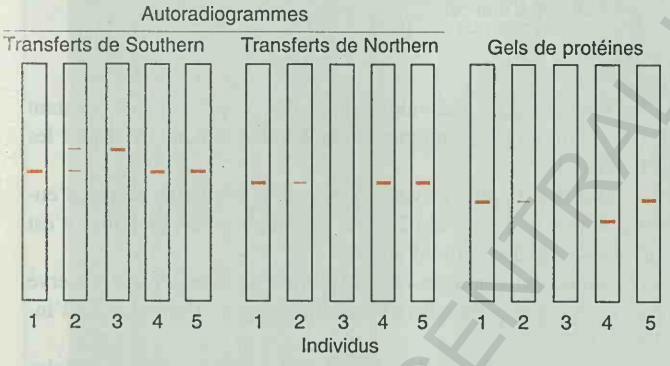
c. Une sonde d'ADNc marquée s'hybride avec les fragments génomiques de 3,4 kb et 2,2 kb. Le fragment *Taq*I de 1,2 kb s'hybride avec le fragment génomique de 3,4 kb. Si le gène de la phosphatase est présent en une seule copie, avec quel fragment génomique le fragment *Taq*I de 1,1 kb pourrait-il s'hybrider ?

d. Quelle partie du gène le fragment génomique de 3,0 kb représente-t-il ?

(Problème 19 présenté grâce à l'amabilité de Joan McPherson. De A. J F. Griffiths et J. McPherson, *100+Principles of Genetics*. W. H. Freeman and Company, 1989.)

20. L'interféron α est codé par un gène qui ne contient pas d'introns. Le fragment de restriction *Bam*HI contenant le gène entier peut être identifié sur un transfert de Southern par hybridation avec une sonde (^{32}P) spécifique de l'ADNc de l'interféron, laquelle ne reconnaîtra que les séquences de l'interféron.

Afin de déterminer la cause de déficiences immunitaires d'origines inconnues, des échantillons sanguins d'individus malades et sains sont testés pour le gène de l'interféron α et pour son expression. Les autoradiogrammes des transferts de Southern et de Northern ainsi que les gels des protéines sont montrés ci-dessous. Les bandes de protéines sont détectées au moyen d'un anticorps qui reconnaît les séquences de l'interféron α. Les individus 1 et 2 sont normaux du point de vue de vue immunitaire ; les individus 3, 4 et 5 présentent des déficiences immunitaires.



a. Quels sont les individus qui sont homozygotes pour le gène de l'interféron α ?

b. Quelles sont, croyez-vous, les causes des déficiences immunitaires des individus 3, 4, et 5 ? Décrivez le type de mutation impliqué pour chaque individu.

(Problème 20 présenté grâce à l'amabilité de Joan McPherson. De A. J F. Griffiths et J. McPherson, *100+Principles of Genetics*. W. H. Freeman and Company, 1989.)

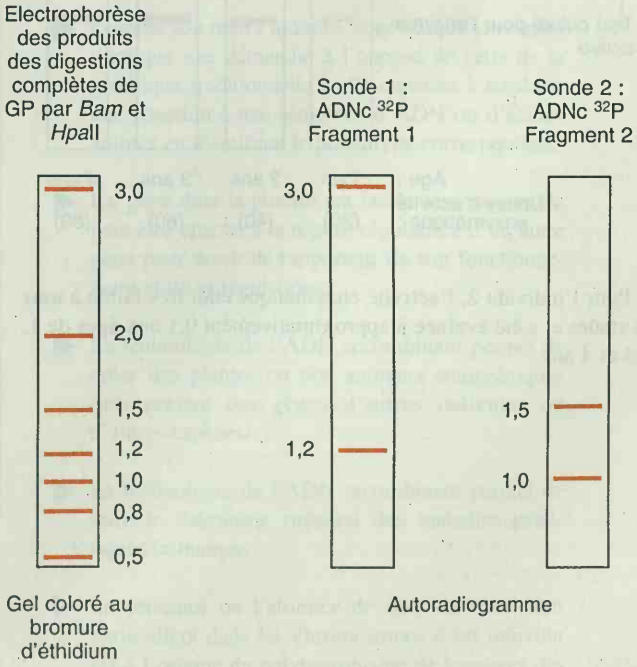
21. Un fragment d'ADN génomique humain contenant le gène *P* est excisé d'un vecteur λ au moyen de l'enzyme *Hin*dIII et les extrémités du fragment (GP) sont marquées au ^{32}P. Le fragment est d'abord digéré par *Bam* en donnant deux fragments, de 1,0 kb et 10 kb. Le fragment de 10 kb est digéré partiellement par *Hpa*II et les produits de la digestion soumis à l'électrophorèse, en fournissant les résultats suivants :

Autoradiogramme de la digestion par Hpa*II *du fragment GP

a. Faites une carte du fragment génomique en indiquant les sites *Bam* et *Hpa*II.

L'ADNc du gène *P* peut être coupé par *Hpa*II en seulement deux fragments. Tous deux sont marqués au ^{32}P et utilisés comme sondes pour tester sur des transferts de Southern les fragments d'une digestion complète de GP par les enzymes *Hpa*II et *Bam* (ci-dessous).

Transferts de Southern des digestion complètes



b. Tracez un diagramme comparant l'ADN génomique avec l'ADNc. Indiquez les sites de restriction. Expliquez les différences.

ECUAD / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

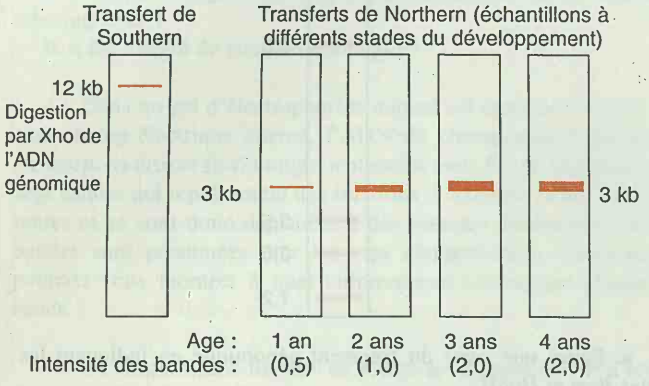
c. Marquez le site *Hpa*II sur l'ADNc ainsi que l'orientation des deux fragments *Hpa*.

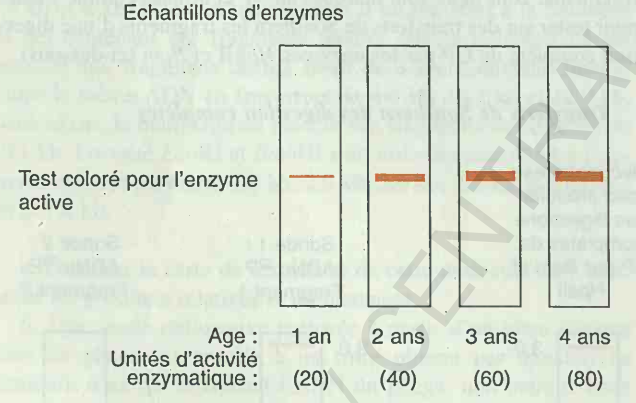
(Problème 21 présenté grâce à l'amabilité de Joan McPherson. De A. J F. Griffiths et J. McPherson, *100+Principles of Genetics*. W. H. Freeman and Company, 1989.)

22. Deux enfants sont examinés pour l'expression d'un gène (*D*) qui code pour une enzyme importante pour le développement musculaire. Les résultats de ces examens sont les suivants :

Individu 1

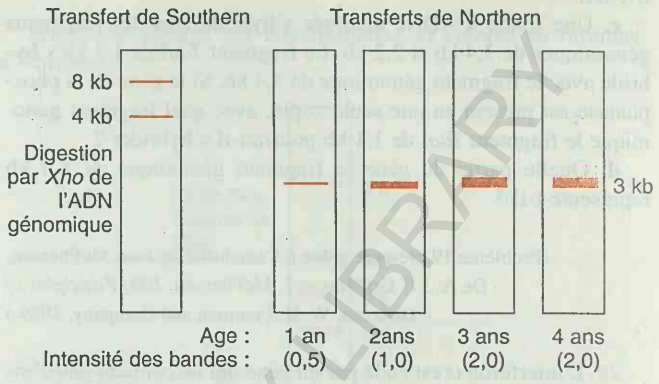
Sonde : gène *D* ^{32}P : Autoradiogrammes

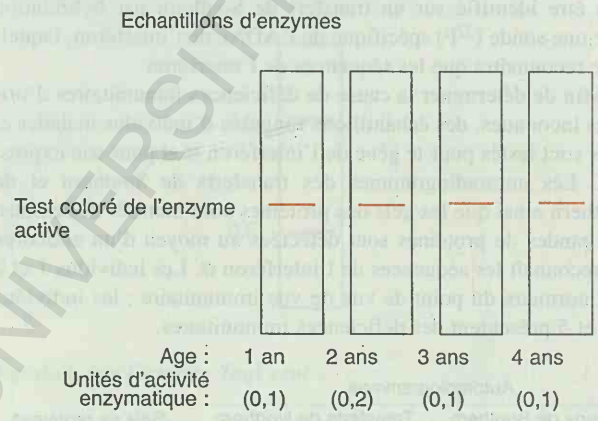




Pour l'individu 2, l'activité enzymatique était très faible à tous les stades et a été évaluée à approximativement 0,1 aux âges de 1, 2, 3 et 4 ans.

Individu 2





a. Pour les deux individus, tracez des graphiques représentant l'expression du gène en fonction du développement. (Marquez les deux axes.)

b. Comment pourriez-vous expliquer le très faible niveau d'enzyme active de l'individu 2 ? (La dégradation des protéines n'est qu'une possibilité parmi d'autres.)

c. Comment pourriez-vous expliquer le changement observé pour le transfert de Southern lorsqu'on compare l'individu 2 à l'individu 1 ?

d. Si un seul gène muté a été détecté lors des études familiales des deux enfants, définissez chacun d'eux comme homozygote ou hétérozygote pour le gène *D*.

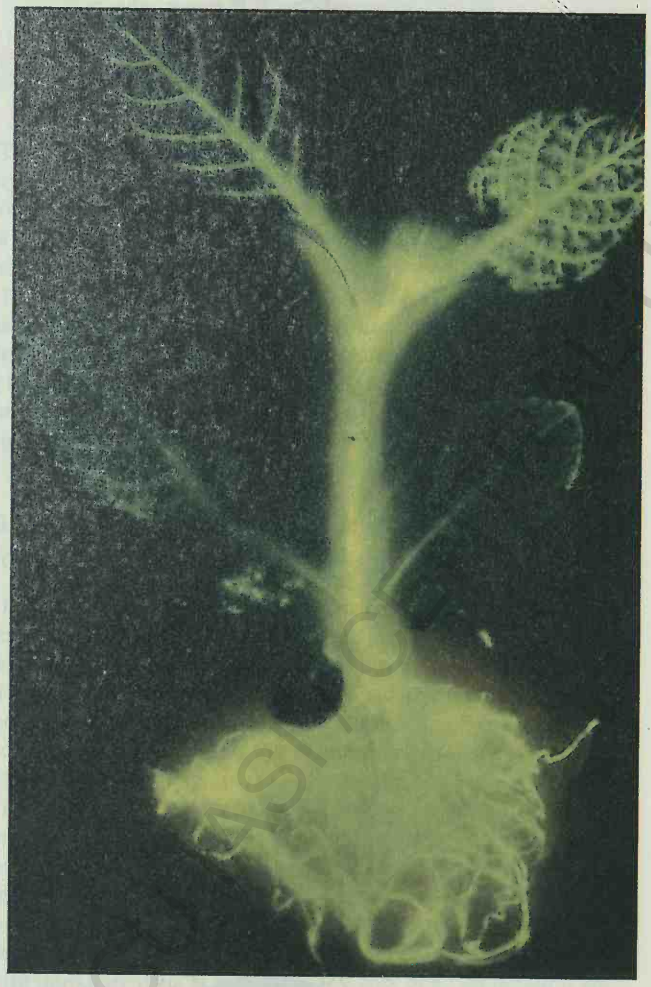
(Problème 22 présenté grâce à l'amabilité de Joan McPherson. De A. J F. Griffiths et J. McPherson, *100+Principles of Genetics*. W. H. Freeman and Company, 1989.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

15

Les applications de l'ADN recombinant



Plante de tabac transgénique exprimant le gène de la luciférase du ver luisant. (Keith Wood, Promega, Madison, Wisconsin)

CONCEPTS-CLÉS

- Le clonage d'un gène permet de l'utiliser pour de nombreuses applications de biologie moléculaire. Parmi celles-ci, retenons le criblage de préparations d'acides nucléiques, de chromosomes ou de cellules, ainsi que la manipulation in vitro pour créer des génotypes nouveaux impossibles à produire par les méthodes d'élevage traditionnelles.
- Les gènes peuvent être mutés de façon dirigée, qu'il s'agisse du changement spécifique d'une seule paire de bases ou de modifications plus étendues, grâce à différentes techniques de mutagénèse in vitro.
- Comme son nom l'indique, la génétique «inverse» implique une démarche à l'opposé de celle de la génétique traditionnelle : elle consiste à attribuer une fonction à une séquence d'ADN ou d'acides aminés en identifiant le phénotype correspondant.
- Un gène dont le produit est facilement mesurable peut être attaché à la région régulatrice d'un autre gène pour servir de rapporteur de son fonctionnement et de sa régulation.
- La technologie de l'ADN recombinant permet de créer des plantes ou des animaux transgéniques (qui portent des gènes d'autres individus ou d'autres espèces).
- La technologie de l'ADN recombinant permet de faire le diagnostic prénatal des maladies génétiques humaines.
- La présence ou l'absence de sites de restriction particuliers dans les chromosomes d'un individu est à l'origine du polymorphisme de longueur des fragments de restriction qui fournit des loci pour la cartographie du génome et pour le diagnostic de déficiences génétiques liées à ces loci.

UNIVERSITY LIBRARY

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit les méthodes qui permettent de créer et d'analyser des molécules d'ADN recombinant. Nous allons allons à présent voir comment ces méthodes nous permettent de modifier des gènes au niveau de sites spécifiques, puis d'utiliser ces gènes modifiés pour changer les propriétés de bactéries, de moisissures, de plantes et de certains vertébrés. En plus de cela, la méthodologie de l'ADN recombinant a ouvert des perspectives nouvelles pour la compréhension, le diagnostic et la thérapie des maladies héréditaires humaines.

Mutagénèse in vitro

Pour la première fois dans l'histoire de l'humanité, les généticiens sont en mesure de programmer des changements dans le matériel génétique. La fin des années 1970 et le début des années 1980 ont vu se développer des techniques qui permettent de modifier des paires de bases bien spécifiques donc de créer différents types de mutations ponctuelles, de délétions et d'insertions dans des fragments d'ADN clonés. Les fragments d'ADN ou les gènes ainsi modifiés - parfois appelés familièrement des gènes «haute couture» ou «faits sur mesure» - peuvent ensuite être réintroduits dans l'organisme d'origine pour observer les effets des mutations sur le phénotype.

Substitutions de nucléotides

Comme le montre la figure 15-1, des substitutions de bases peuvent être introduites dans un segment d'ADN cloné dans un plasmide, après y avoir créé de courtes régions monocaténaires. Ces régions monocaténaires sont produites soit par une digestion partielle à l'aide de l'exonucléase III après une coupure par une enzyme de restriction soit en exploitant l'activité exonucléasique de l'ADN polymérase I de *E.coli*. En l'absence de désoxyribonucléotides triphosphates, cette enzyme digère un des brins d'un duplex d'ADN dans la direction 3' vers 5'. Si un seul triphosphate est disponible pour la réaction, la digestion s'arrêtera lorsque la base qui se trouve sur l'autre brin est complémentaire du nucléotide qui est fourni. Dans l'exemple de la figure 15-1, le dTTP est le seul nucléotide triphosphate disponible et la digestion qui suit le clivage de d'une molécule d'ADN circulaire crée un segment monocaténaire de 4 pb à une extrémité et de 5 pb à l'autre extrémité. La présence d'ADN monocaténaire rend possible l'action des ions bisulfite qui désaminent les cytosines localisées dans ces régions pour donner des uraciles, ce qui, comme nous le verrons au chapitre 19, provoque des transitions C→T. Après ce traitement au bisulfite, les plasmides sont recircularisés et les brèches sont comblées à l'aide de l'ADN polymérase I et de la ligase.

L'incorporation d'analogues de bases peut également être exploitée dans ce but. Ceci se fait aussi en produisant de courtes brèches monocaténaires dans l'ADN bicaténaire sans le cliver au préalable. Cette brèche est ensuite comblée en utilisant une forme particulière de l'ADN polymérase I (voir chapitre 10) en présence de trois nucléotides triphosphates et de la *N*-4-hydroxycytosine à la place du

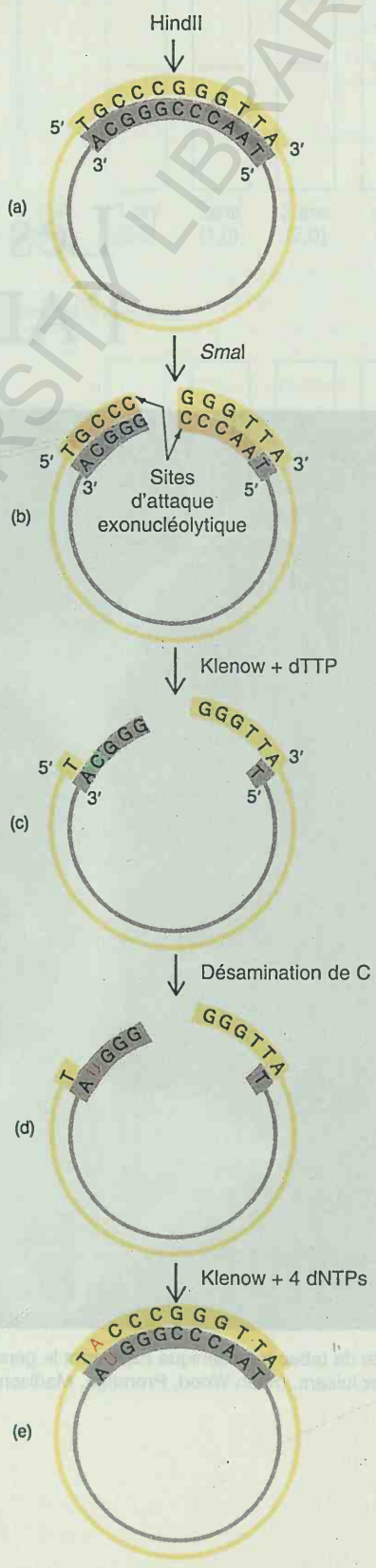


Figure 15-1. Création d'un mutant contenant une substitution de base par la désamination de la cytosine. Un site de restriction ouvert, en l'occurrence *Sma*I (a,b), est traité avec une forme modifiée de l'ADN polymérase I - appelée *fragment de Klenow* - en présence de dTTP. (c) Le fragment de Klenow agit ici comme une exonucléase en effectuant une digestion simple brin de 3' vers 5' jusqu'à ce qu'il rencontre un résidu T. (d) La désamination des résidus C des brins exposés s'effectue par l'action du bisulfite. La molécule est ensuite réparée par l'addition des quatre dNTPs et du fragment de Klenow. (e) Le résultat net est la substitution d'une paire de bases G-C par une paire A-U.

SUTRO LIBRARY UNIVERSITY

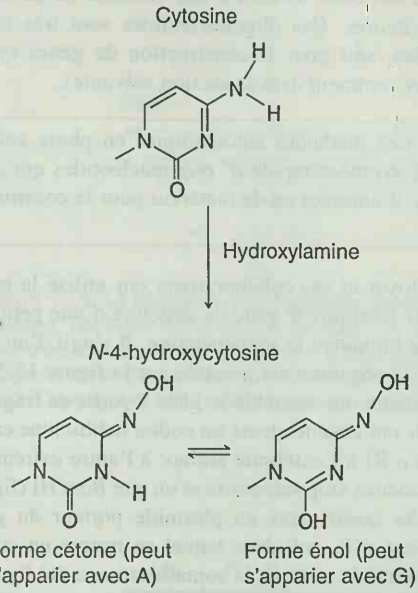


Figure 15-2. La formation de *N*-4-hydroxycytosine par traitement à l'hydroxylamine.

dTTP. La *N*-4-hydroxycytosine existe sous ses deux formes tautomériques (énol et cétone, figure 15-2), ce qui lui permet de s'apparier soit à une guanine soit à une adénine. Cet analogue est incorporé à la place des T mais peut s'apparier à des G. Il en résultera des transitions T→C.

Des modifications moins spécifiques peuvent être introduites dans des régions monocaténaires en effectuant la réaction de polymérisation en l'absence de l'un des quatre désoxyribonucléotides triphosphates. In vitro, la polymérase peut introduire au hasard l'une des bases disponibles à la place de la base manquante, mais ce processus est relativement peu efficace.

La mutagénèse dirigée au moyen d'oligonucléotides

Les méthodes décrites jusqu'ici faisaient appel à la présence de sites de restriction propices aux abords de la région à modifier. Comment alors créer une mutation dans une séquence qui ne bénéficie pas de cette situation favorable? Pour résoudre ce genre de problème, Michael Smith a inventé une méthode efficace qui utilise de petits oligonucléotides de synthèse (généralement longs de 15 à 25 bases) dont la préparation est décrite au chapitre 14.

Dans une première étape, le gène que l'on désire muter est cloné dans un vecteur dérivé d'un phage dont le génome est une molécule d'ADN monocaténaire, par exemple le phage M13. Un oligonucléotide synthétique sert d'amorce à la synthèse in vitro du brin complémentaire du vecteur M13 (figure 15-3). L'amorce synthétique peut contenir n'importe quelle base «erronée» que l'on désire introduire dans la séquence. Il y aura donc un défaut d'appariement au niveau de cette base mais si l'hybridation est réalisée à basse température et à concentration saline élevée, une ou deux bases mal appariées pourront être tolérées dans la double hélice. Le brin complémentaire est synthétisé in vitro par l'ADN polymérase I et l'ADN double brin obtenu peut alors être introduit par transformation dans *E.coli* où il poursuivra sa réplication in vivo et produira finalement un grand nombre d'exemplaires de la séquence mutée que l'on désire.

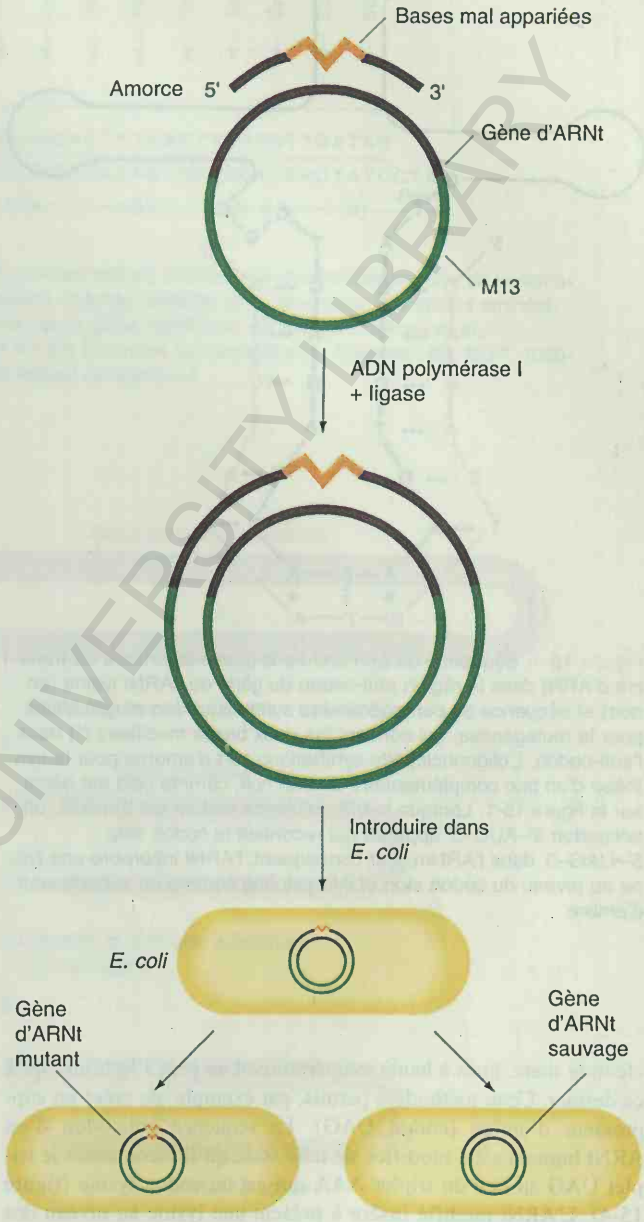


Figure 15-3. L'utilisation d'oligonucléotides de synthèse pour créer un mutant de substitution. L'oligonucléotide synthétique contient 12 à 15 paires de bases complémentaires de la région d'ADN à mutagéniser, mis à part une ou deux bases. En présence d'un ADN simple brin contenant l'ADN cloné complémentaire, si les conditions d'hybridation sont appropriées et si les bases mal appariées sont au centre de la région hybride, l'oligonucléotide s'apparie à l'ADN complémentaire (malgré la présence d'un ou deux mauvais appariements). L'oligonucléotide sert d'amorce à la synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase I. L'ADN bicaténaire obtenu est introduit dans *E.coli* où la molécule se réplique pour produire 50 % d'ADN mutant et 50 % d'ADN sauvage.

Notons que l'oligonucléotide de synthèse peut ensuite être utilisé pour distinguer le mutant du type sauvage, par des expériences d'hybridation. A basse température, l'ADN qui contient la base mutée peut s'hybrider à l'ADN sauvage aussi bien qu'à l'oligonu-

SOUTH CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

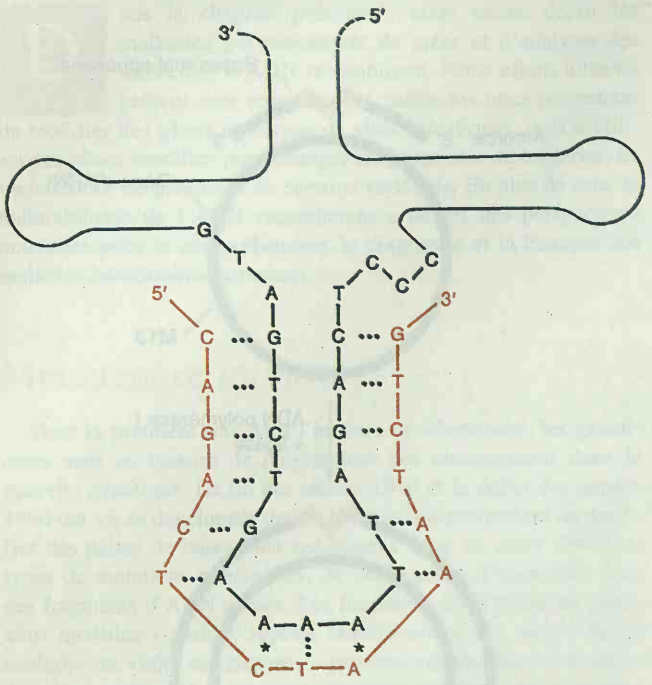


Figure 15-4. Séquence du brin anti-sens (complémentaire au transcrit d'ARN) dans la région anti-codon du gène de l'ARNt lysine (en noir) et séquence du pentadécamère synthétique (en rouge) utilisé pour la mutagénèse, qui contient les deux bases modifiées (*) dans l'anti-codon. L'oligonucléotide synthétique sert d'amorce pour la synthèse d'un brin complémentaire du brin noir, comme cela est décrit sur la figure 15-1. Lorsque le brin anti-sens mutant est transcrit, un anticodon 3'–AUC–5' apparaît qui reconnaît le codon stop 5'–UAG–3' dans l'ARNm. Par conséquent, l'ARNt incorpore une lysine au niveau du codon stop et il fonctionne comme un suppresseur d'ambre.

cléotide muté, mais à haute température, il ne peut s'hybrider qu'à ce dernier. Cette méthode a permis, par exemple, de créer un suppresseur d'ambre (codon UAG). La séquence anticodon d'un ARNt humain a été modifiée de telle sorte qu'il reconnaisse le triplet UAG au lieu du triplet AAA qui est un codon lysine (figure 15-4). L'ARNt modifié insère à présent une lysine au niveau des codons terminateurs de chaîne UAG.

La synthèse de gènes

Les oligonucléotides ne servent pas seulement d'amorces ou de sondes, mais aussi de matériau pour la construction de gènes. Au milieu des années 60, Gobind Khorana synthétisa l'ADN codant pour l'ARNt de l'alanine (sa séquence avait déjà été déterminée par Robert Holley). Il synthétisa d'abord de courts polynucléotides correspondant à chacun des brins en ajoutant les bases une à une. Mais il s'arrangea pour que les fragments portent des extrémités complémentaires et chevauchantes et parvint finalement à synthétiser tout le gène de l'ARNt. La méthode de Khorana a été remplacée depuis par des méthodes plus simples qui consistent à ajouter les nucléotides un à un à une chaîne d'ADN fixée sur une résine insoluble. La synthèse de l'ADN en phase solide a maintenant été automatisée et les synthétiseurs d'oligonucléotides permettent de construire des brins d'ADN d'une centaine de paires de bases en quelques heures. Ces oligonucléotides sont très utilisés soit comme sondes, soit pour la construction de gènes synthétiques (nous verrons comment dans la section suivante).

Message Les méthodes automatiques en phase solide permettent la synthèse rapide d' oligonucléotides qui serviront de sondes, d'amorces ou de matériau pour la construction de gènes.

Herbert Boyer et ses collaborateurs ont utilisé la méthode de Khorana pour fabriquer le gène de structure d'une petite hormone de croissance humaine, la somatostatine. Il s'agit d'un petit polypeptide dont la séquence est montrée sur la figure 15-5. Boyer et ses collaborateurs ont assemblé le gène à partir de fragments chevauchants. Ils ont ensuite ajouté un codon méthionine et un site de restriction *Eco* RI à l'extrémité amino; à l'autre extrémité, ils ont ajouté deux codons stop successifs et un site *Bam* HI (figure 15-6). Le gène a été inséré dans un plasmide porteur du gène de la β–galactosidase d'*E. coli* dans lequel se trouve un site *Eco* RI. L'autre extrémité du gène de la somatostatine a été ligaturée dans un site *Bam* HI du plasmide. Les bactéries *E. coli* sélectionnées pour la présence du plasmide produisent une protéine chimère dans laquelle une partie de la β–galactosidase est fusionnée avec la somatostatine par l'intermédiaire d'un résidu méthionine. Le bromure de cyanogène coupe les protéines au niveau des résidus méthionine de sorte que l'hormone active (qui ne contient pas de résidu méthionine) peut être libérée par ce type de traitement (figure 15-7).

Un autre exemple de synthèse de gènes au moyen d'oligonucléotides produits par synthèse automatisée en phase solide est fourni par les travaux de John Abelson et Jeffrey Miller et leurs collaborateurs qui, en 1986, ont construit des gènes d'ARNt artificiels in vitro. En particulier, ils ont construit le gène de l'ARNt de la phénylalanine en introduisant deux modifications dans l'anticodon de telle sorte qu'il lise le codon terminateur UAG (ambre) et devienne un ARNt suppresseur d'ambre. Le gène a été construit par l'assemblage de six oligonucléotides contenant les deux modifications. Ces oligonucléotides ont été synthétisés séparément avec de courtes séquences chevauchantes qui permettent leur assemblage par hybridation in vitro. Comme dans l'exemple précédent, des sites de restriction spécifiques étaient présents aux extrémités du gène reconstitué. La figure 15-8 résume les étapes de cette synthèse. Après hybridation et ligature, le gène fut inséré dans un vecteur d'expression qui contient un promoteur. Comme le gène code pour un suppresseur de non-sens, la capacité à supprimer une mutation non-sens dans le gène *lac Z*, qui code pour la β–galactosidase, a servi de critère pour vérifier la présence d'un ARNt suppresseur actif. L'expérience tout entière a pu être réalisée en l'espace de quelques jours, ce qui contraste avec la méthode développée et uti-

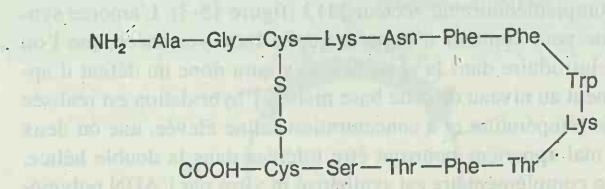


Figure 15-5. La séquence des acides aminés de l'hormone somatostatine.

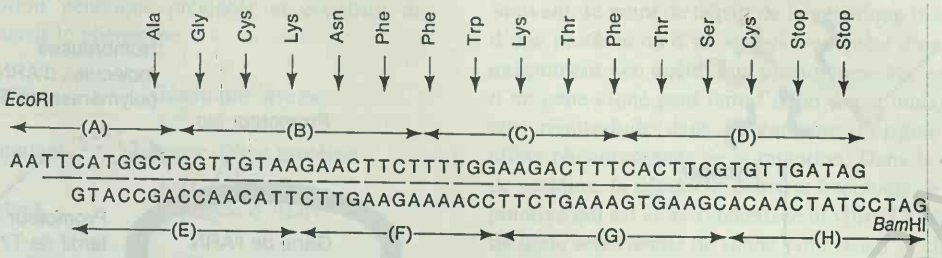


Figure 15-6. La séquence des fragments chevauchants (désignés par des lettres) utilisés pour synthétiser le gène de la somatostatine. Un triplet méthionine a été ajouté à l'extrémité 5' de la région codante (déduite de la séquence des acides aminés), suivi d'un site *EcoRI*. Un site *BamHI* a été rajouté à l'autre extrémité de ce gène «artificiel». (D'après K. Itakura et al., «Expression in *Escherichia coli* of a Chemically Synthesized Gene for the Hormone Somatostatine». *Science* 198, 1977, 1056-1063. Copyright © 1977, chez American Association for the Advancement of Science.)

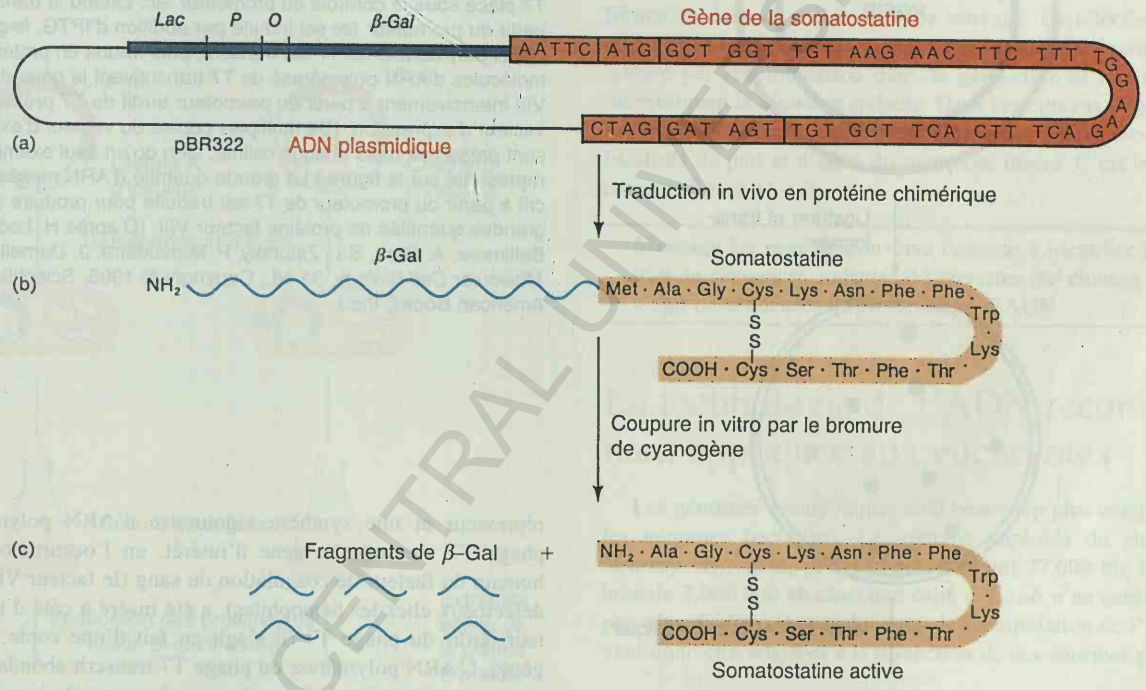


Figure 15-7. Production de somatostatine par *E.coli*. (a) Le plasmide qui contient l'ADN synthétique est introduit dans *E.coli*. (β–Gal = gène de la β–galactosidase; Lac P et O = séquences régulatrices de β–Gal.) (b) La bactérie synthétise une protéine chimérique. (c) La somatostatine est obtenue à partir de la protéine chimérique après traitement par le bromure de cyanogène. (D'après K. Itakura et al., «Expression in *Escherichia coli* of a Chemically Synthesized Gene for the Hormone Somatostatine». *Science* 198, 1977, 1056-1063. Copyright © 1977, chez American Association for the Advancement of Science.)

lisée antérieurement par Khorana, précisément pour construire une molécule d'ARNt.

Expression de gènes eucaryotiques dans des bactéries

Après la synthèse de somatostatine par *E. coli*, de nombreux systèmes ont été mis au point pour faire surproduire des protéines étrangères par cette bactérie. Dans un cas, la polymérase du phage T7 transcrit les gènes à partir d'un promoteur de T7. En fin d'infection, le phage T7 synthétise des quantités énormes des produits des gènes dits tardifs. A ce stade, les gènes de la bactérie hôte ne sont plus transcrits et seules les protéines du phage sont encore synthétisées. La figure 15-9 décrit deux aspects du système. Le gène de l'ARN polymérase de T7 est transcrit à partir du promoteur *lac* et se trouve normalement réprimé par la protéine répresseur *lac* (voir Chapitre 19). L'addition de l'inducteur gratuit IPTG, analogue du lactose pour l'induction du promoteur *lac*, inactive le

BOUJIA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

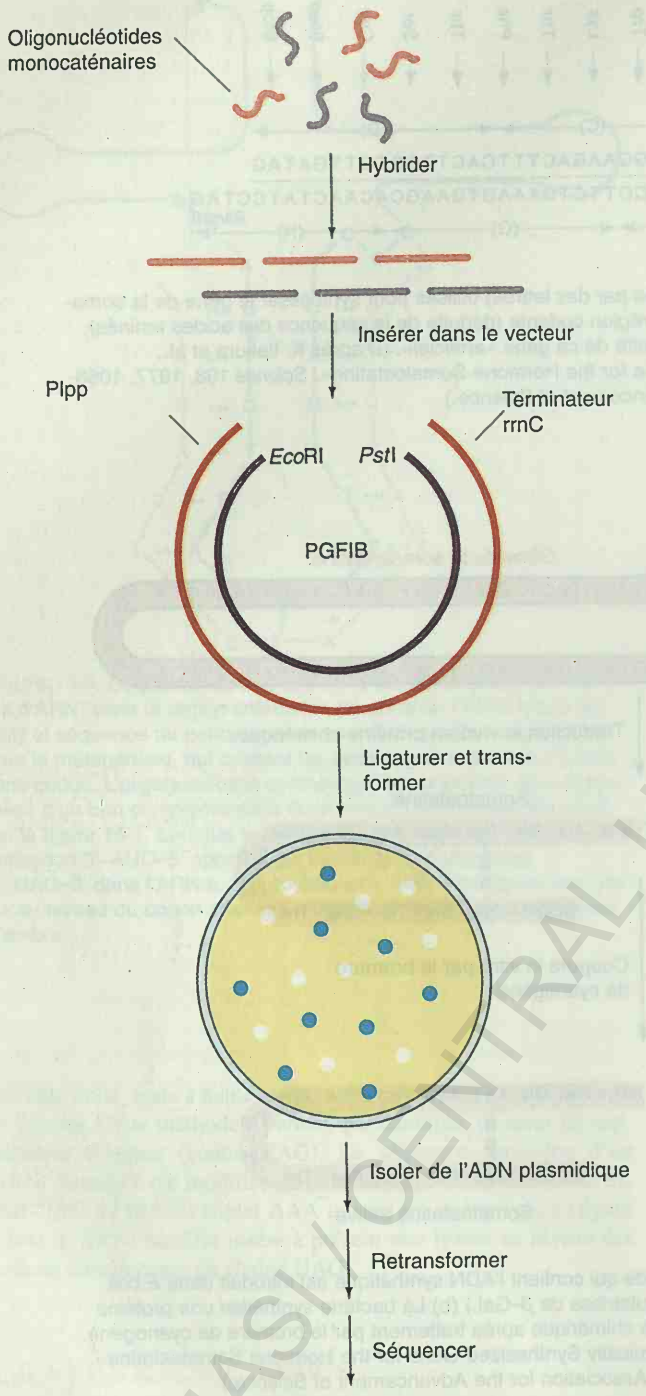


Figure 15-8. La synthèse d'un gène d'ARNt suppresseur. Les six oligonucléotides chevauchants sont appariés, liés de façon covalente et l'ADN résultant est introduit dans un vecteur d'expression conçu pour exprimer l'ARNt suppresseur. Le vecteur contient des sites de restriction (*Eco*RI et *Pst* I) ce qui permet l'insertion du gène synthétique, un promoteur (Plpp) provenant d'un gène de lipopolysaccharide et le terminateur (rrnC) d'un des gènes de structure de l'ARN ribosomique. Le plasmide est introduit, par transformation, dans une bactérie qui contient une mutation ambre dans le gène *lacZ*. Ces bactéries ne font donc pas de β-galactosidase. Par contre les transformants qui expriment l'ARNt suppresseur produisent de la β-galactosidase (ce qui se voit à la couleur bleue des colonies). Ces transformants sont ensuite analysés plus en détail.

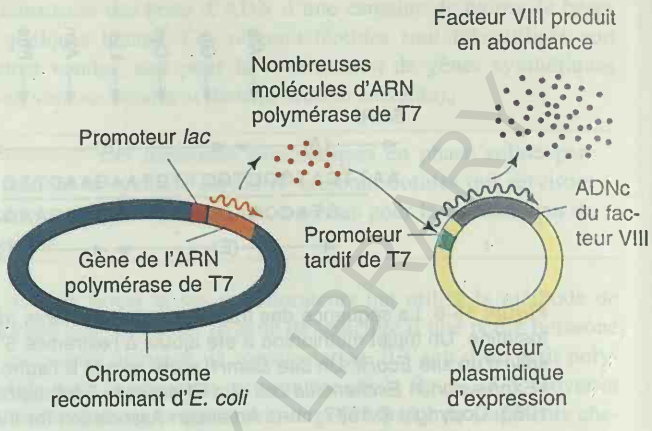


Figure 15-9. Système de vecteurs pour l'expression en deux étapes, utilisant l'ARN polymérase du bactériophage T7 et le promoteur tardif de T7. Le chromosome d'une souche d'*E. coli* manipulée à cet effet contient un exemplaire du gène de l'ARN polymérase de T7 placé sous le contrôle du promoteur *lac*. Quand la transcription à partir du promoteur *lac* est induite par addition d'IPTG, le gène de l'ARN polymérase de T7 est transcrit, puis traduit en protéine. Les molécules d'ARN polymérase de T7 transcrivent le gène du facteur VIII intensivement à partir du promoteur tardif de T7 présent sur le vecteur d'expression. (De multiples copies du vecteur d'expression sont présentes dans chaque cellule, bien qu'un seul exemplaire soit représenté sur la figure.) La grande quantité d'ARN messager transcrit à partir du promoteur de T7 est traduite pour produire de grandes quantités de protéine facteur VIII. (D'après H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3è éd., Copyright © 1995, Scientific American Books, Inc.)

répresseur et une synthèse vigoureuse d'ARN polymérase du phage T7 s'ensuit. Le gène d'intérêt, en l'occurrence le gène humain du facteur de coagulation du sang (le facteur VIII, qui est défectueux chez les hémophiles), a été inséré à côté d'un promoteur tardif du phage T7 (il s'agit en fait d'une copie ADNc du gène). L'ARN polymérase du phage T7 transcrit abondamment ce gène, ce qui résulte en la production de quantités importantes de facteur VIII par les bactéries.

De nombreuses protéines telles que l'insuline humaine (figure 15-10), l'hormone de croissance humaine (figure 15-11) et de nombreuses molécules pharmaceutiques sont produites en quantités industrielles par des bactéries ou des champignons manipulés génétiquement. La figure 15-12 montre un exemple où un nouvel antibiotique créé par génie génétique s'est avéré changer la couleur des colonies de bactéries qui le synthétisent.

La génétique inverse

La démarche «normale» en génétique classique consiste, à partir d'un phénotype mutant, à identifier et à localiser le gène concerné, puis à le cloner et le séquencer. La **génétique inverse** implique une démarche opposée, rendue possible par la méthodologie de l'ADN recombinant. Elle part de la séquence d'une protéine ou d'un cadre ouvert de lecture dans l'ADN pour lesquels il

n'y a pas d'information génétique préalable et construit des mutants pour en découvrir le phénotype.

Génétique	Génétique inverse
phénotype mutant	séquence d'une protéine
↓	↓
allèle mutant	séquence d'ADN
↓	↓
séquence d'ADN	allèle mutant
↓	↓
séquence de la protéine	phénotype mutant

Souvent, le point de départ de la génétique inverse est la séquence d'une protéine ou d'un «gène» «en quête d'une fonction» ou plus exactement «en quête d'un phénotype». Par exemple, la séquence d'un gène cloné peut faire l'objet d'une mutagénèse in vitro puis être réintroduite dans l'organisme d'origine pour observer les effets phénotypiques de la mutation. Dans le cas d'une séquence de protéine, la démarche consiste à remonter à la séquence d'ADN putative qui est alors synthétisée in vitro. La séquence d'ADN synthétique sert ensuite de sonde pour isoler et cloner le gène correspondant. Ce gène peut alors faire l'objet d'une mutagénèse in vitro pour identifier sa fonction sur la base du phénotype mutant. L'importance de cette approche ira grandissant au fur et à mesure du développement de projets génomiques - le séquençage de génomes entiers. La génomique (voir le chapitre 17) découvre de nombreux cadres ouverts de lecture (ORF, pour «Open Reading Frame» en anglais) dont il faut identifier la fonction.

Deux outils importants en génétique inverse sont l'**interruption de gène** et le **transplacement de gène**. Un marqueur sélectionnable est inséré dans un gène cloné qui est introduit par transformation dans un cellule de type sauvage. La sélection du marqueur produit des transformants chez lesquels le marqueur s'est intégré par recombinaison dans le gène-cible et l'a inactivé en interrompant la séquence codante. Dans certains cas, le gène modifié in vitro s'est substitué au gène-cible grâce à deux crossing-over localisés de part et d'autre du marqueur inséré. C'est le transplacement (figure 15-13).

Message La génétique inverse consiste à identifier la fonction de séquences codantes découvertes par clonage. Il peut s'agir de séquences de protéines ou d'ADN.

La technologie de l'ADN recombinant appliquée aux eucaryotes

Les génomes eucaryotiques sont beaucoup plus complexes que les génomes bactériens. Le génome haploïde du champignon *Neurospora crassa,* par exemple, contient 27.000 kb, le génome humain 3.000.000 kb alors que celui d'*E.coli* n'en contient qu'un peu plus de 4000. Les techniques de manipulation de l'ADN doivent donc être adaptées à la dissection de ces énormes génomes.

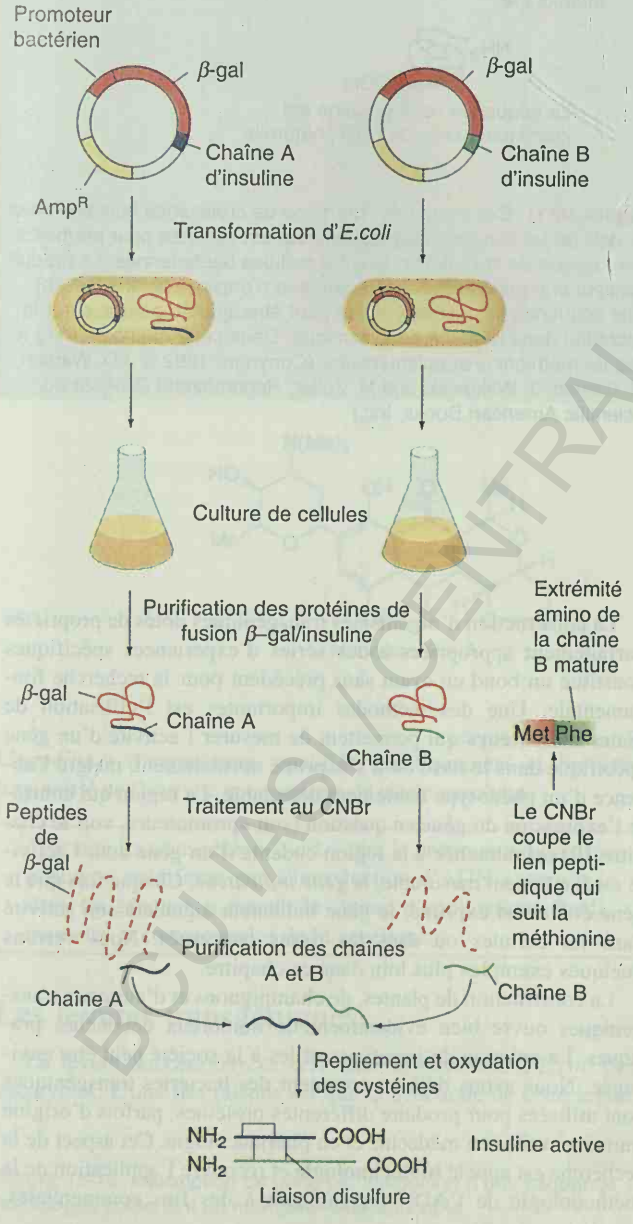
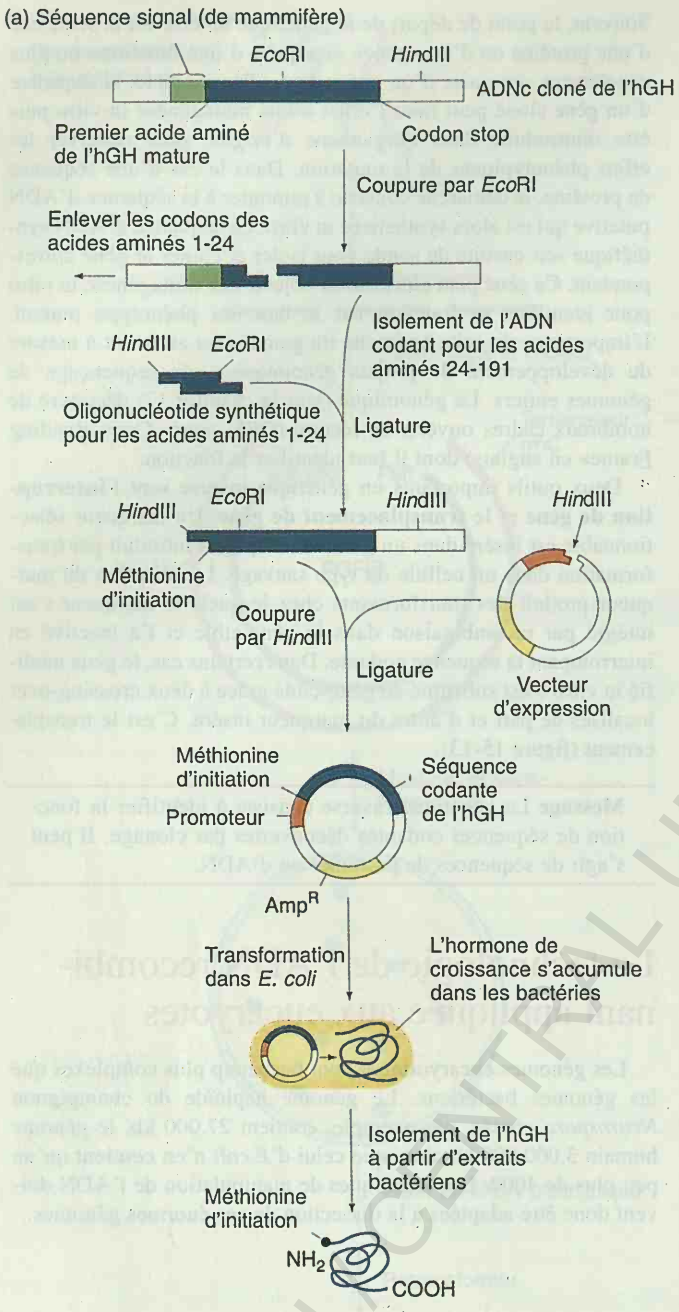


Figure 15.10. Expression de l'insuline humaine chez *E. coli.* Les deux chaînes d'insuline sont synthétisées séparément sous forme de protéines de fusion avec la β–galactosidase. Elles sont libérées par traitement chimique, puis mélangées, et de l'insuline active est formée. (Copyright 1992 © J.D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski and M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2è éd. Scientific American Books, Inc.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY



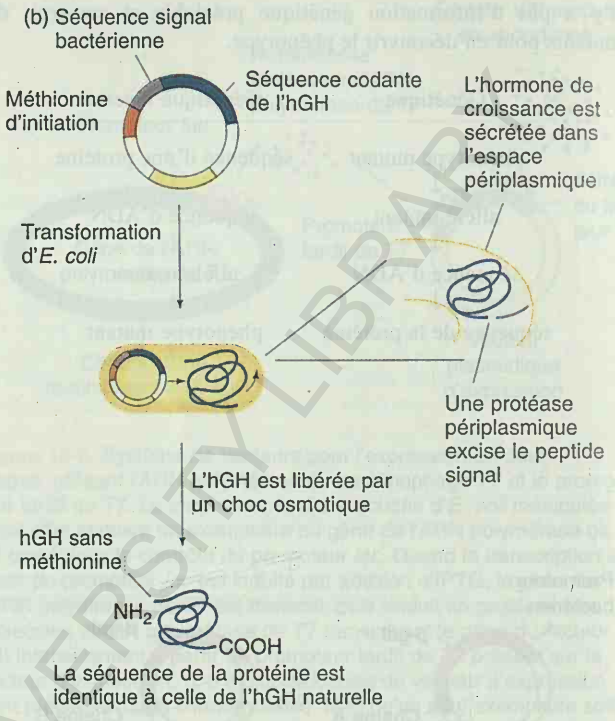


Figure 15-11. Expression de l'hormone de croissance humaine chez *E. coli*. (a) La séquence signal humaine est éliminée pour permettre l'expression de la protéine dans les cellules bactériennes. Le produit contient une méthionine supplémentaire d'origine bactérienne. (b) Une séquence signal bactérienne peut être ajoutée pour assurer la sécrétion dans l'espace périplasmique. Dans cette méthode, il n'y a pas de méthionine supplémentaire. (Copyright 1992 © J.D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski and M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2è éd. Scientific American Books, Inc.)

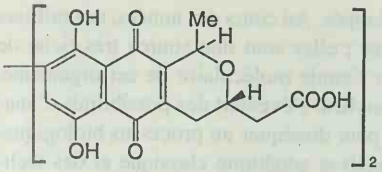
Les organismes transgéniques et la recherche en génétique moléculaire

Un **organisme transgénique** est défini comme provenant d'une cellule dont le génome a été modifié par l'introduction d'ADN extrinsèque. (Nous avons déjà rencontré un cas d'organisme transgénique dans notre discussion sur la transformation.) L'ADN extrinsèque peut être une séquence provenant de la même espèce mais qui a subi des manipulations ou provenir d'une espèce différente. Le gène d'intérêt dans l'échantillon d'ADN extrinsèque est le **transgène**. On peut introduire l'ADN dans une cellule de toute une série de façons : par transformation, par injection, par infection virale ou par bombardement avec des microprojectiles de tungstène enrobés d'ADN (figure 15-14).

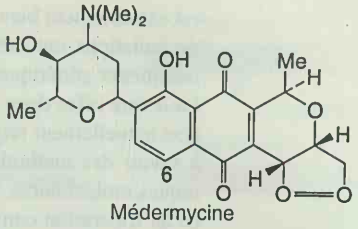
La construction d'organismes transgéniques dotés de propriétés parfaitement appropriées à des séries d'expériences spécifiques constitue un bond en avant sans précédent pour la recherche fondamentale. Une des méthodes importantes est l'utilisation de **gènes indicateurs** qui permettent de mesurer l'activité d'un gène spécifique dans le tissu où il s'exprime normalement, malgré l'absence d'un phénotype facilement détectable. La région qui contrôle l'expression du gène en question (son «promoteur», voir le chapitre 19) est rattachée à la région codante d'un gène dont l'activité est facilement mesurable, le *gène indicateur*. Chaque fois que le gène étudié est exprimé, le gène indicateur signalera son activité dans les cellules où dans les tissus concernés. Nous verrons quelques exemples plus loin dans ce chapitre.

La construction de plantes, de champignons et d'animaux transgéniques ouvre bien évidemment de nombreux débouchés pratiques. La création de génotypes utiles à la société peut être envisagée. Nous avons déjà vu comment des bactéries transgéniques sont utilisées pour produire différentes protéines, parfois d'origine humaine, utiles en médecine et en pharmacologie. Cet aspect de la recherche est appelé **biotechnologie** et recouvre l'application de la méthodologie de l'ADN recombinant à des fins commerciales.

JASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Actinorhodine



Médermycine

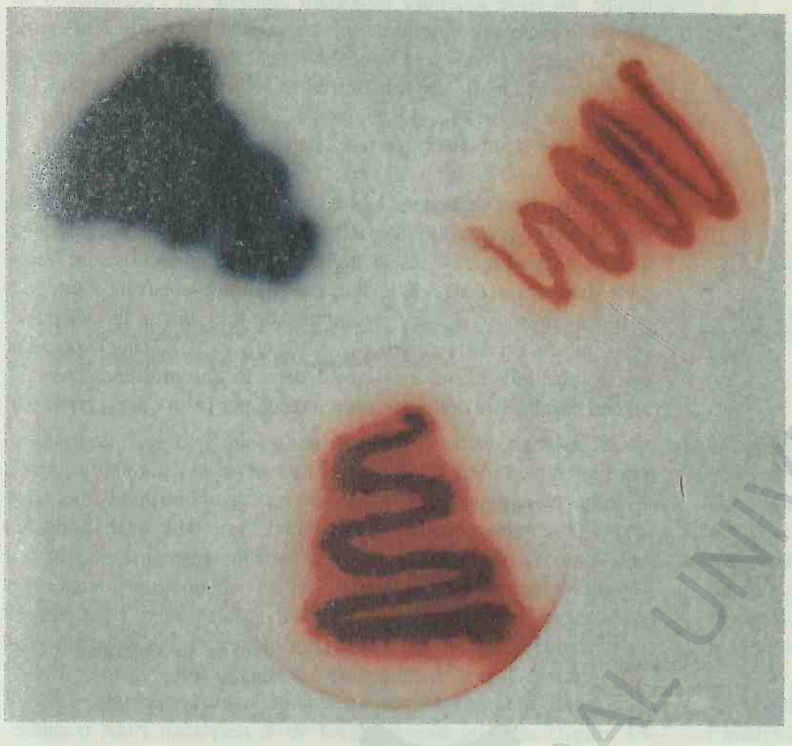
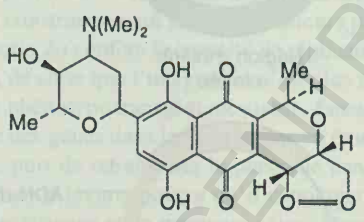


Figure 15-12. Bactéries modifiées par génie génétique. La figure montre comment de nouveaux antibiotiques peuvent être synthétisés par des bactéries manipulées génétiquement. Diverses souches de *Streptomyces* produisent des antibiotiques apparentés mais différents. Une espèce produit l'actinorhodine qui est bleue à pH alcalin. Une autre espèce produit la médermycine qui est brune. Par clonage des gènes de la deuxième espèce et leur insertion dans un plasmide qui a été ensuite introduit dans la première, on a obtenu parmi les transformants des bactéries qui avaient acquis la capacité de synthétiser un nouvel antibiotique, la méderrhodine A, de couleur rouge violacée. Les structures des trois composés sont montrées, avec les stries sur boîtes des bactéries qui les synthétisent. Le nouvel antibiotique, la méderrhodine A, ressemble à la médermycine mais possède un groupement hydroxyle en position 6. Le segment cloné contient probablement un gène qui code pour une hydrolase, gène qui s'exprime lorsqu'il est transféré dans une autre espèce. (Mervyn J. Bibb, John Innes Institute, United Kingdom.)



Méderrhodine A

L'apparition d'organismes modifiés génétiquement et brevetés fera partie de l'activité économique du siècle prochain.

Message La transgénèse, c'est-à-dire la programmation d'un génotype spécifique par l'introduction d'ADN extrinsèque dans un génome, a étendu le champ d'applications fondamentales et commerciales de la génétique.

Les levures transgéniques

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est devenue l'*E.coli* des eucaryotes. L'une des raisons est que la génétique de cette levure

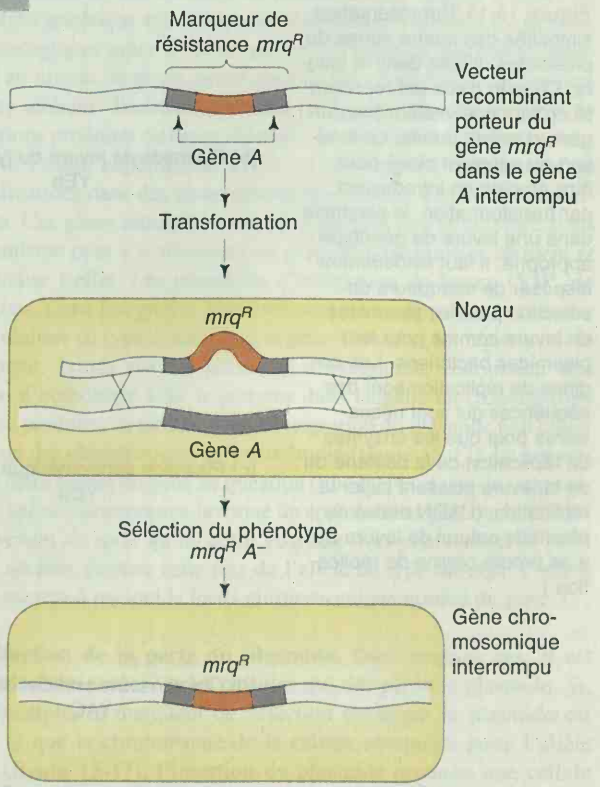


Figure 15-13. Interruption de gène par intégration d'une séquence homologue contenant un marqueur sélectionnable.

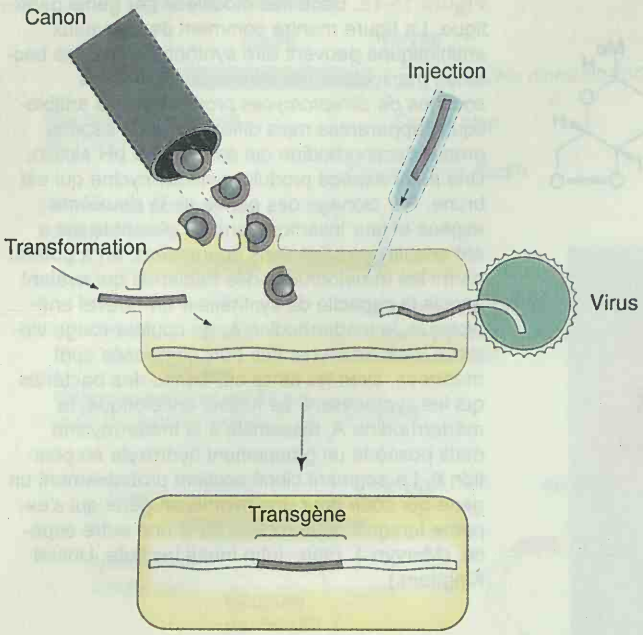


Figure 15-14. Différentes méthodes pour introduire de l'ADN étranger dans une cellule.

est extrêmement bien développée. Au cours des années, des milliers de mutations ont été isolées ; elles sont une source très riche de marqueurs génétiques pour l'étude moléculaire de cet organisme. La levure offre donc au chercheur l'éventail des possibilités d'analyse actuellement requises pour disséquer un processus biologique, à savoir des méthodes d'analyse génétique classique et des techniques moléculaires. L'absence des unes ou des autres est une source de frustration constante pour le généticien moléculaire! Chez la levure, un autre avantage important consiste en l'existence d'un plasmide circulaire naturel de 6,3 kb, appelé **plasmide 2 microns (ou 2μ)** par référence à sa circonférence. Ce plasmide est transmis normalement lors de croisements entre cellules, ainsi qu'à tous les produits de la méiose. Le plasmide 2μ a servi de base pour la construction de plusieurs vecteurs de levure très sophistiqués.

Les vecteurs de levure. Les vecteurs de levure les plus simples sont dérivés de plasmides bactériens dans lesquels un fragment d'ADN de levure a été inséré (figure 15-15a). Quand ils sont introduits dans des cellules de levure, ces plasmides peuvent s'intégrer dans les chromosomes par recombinaison homologue faisant intervenir un seul ou deux crossing-over (figure 15-16). Dans le premier cas, le plasmide entier est intégré dans le chromosome. Dans le second cas, l'allèle cellulaire est remplacé par celui qui est porté par

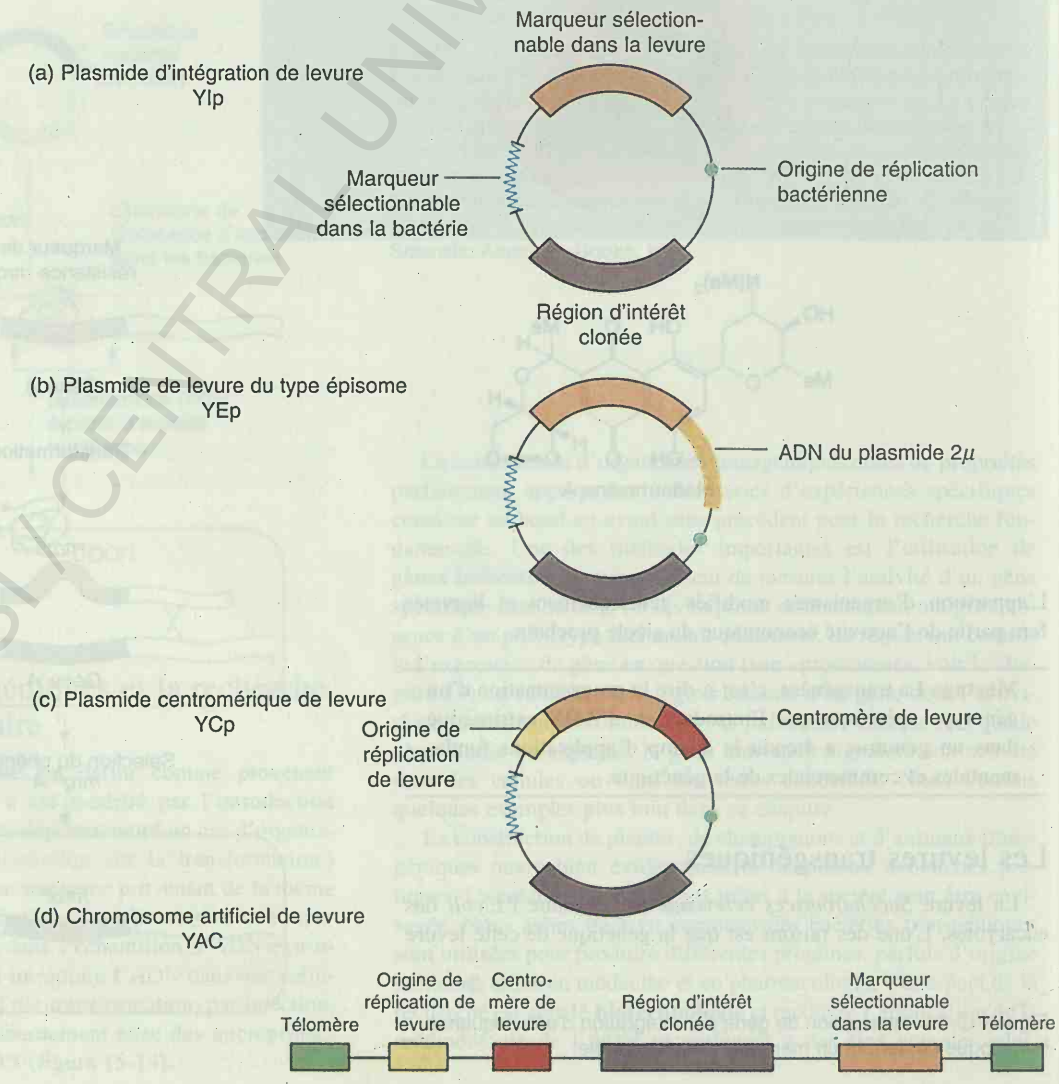


Figure 15-15. Représentation simplifiée des quatre sortes de plasmides utilisés dans la levure. Chacun d'eux est représenté en tant que vecteur pour un gène d'intérêt donné. La fonction du segment cloné peut être étudiée en introduisant, par transformation, le plasmide dans une levure de génotype approprié. Il faut évidemment disposer de marqueurs de sélection pour les plasmides de levure comme pour les plasmides bactériens. Les origines de réplication sont des séquences qui sont nécessaires pour que les enzymes de réplication de la bactérie ou de la levure puissent initier la réplication. (L'ADN dérivé du plasmide naturel de levure 2μ a sa propre origine de réplication.)

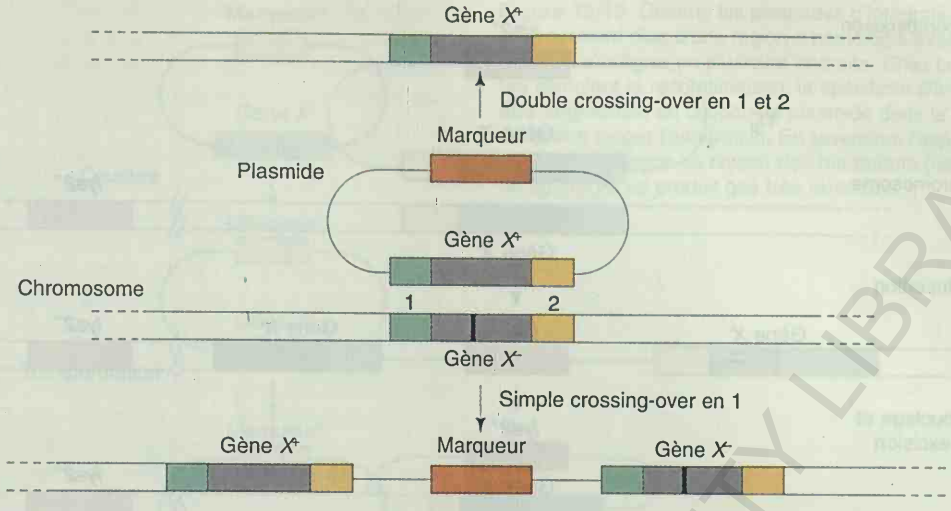


Figure 15-16. Deux voies par lesquelles une cellule de levure contenant le gène défectueux X^- peut être transformée par un plasmide contenant le gène actif X^+. Le gène mutant porte une barre noire. Une simple recombinaison au site 2 peut aussi se produire mais n'est pas représentée.

le plasmide. Les recombinants peuvent être détectés en étalant les cellules sur un milieu qui sélectionne la présence de l'allèle porté par le plasmide. Etant donné que les plasmides bactériens ne peuvent pas se répliquer dans la levure, l'intégration est la seule manière d'obtenir un phénotype transgénique stable. Grâce à ce type de vecteurs, il est par exemple possible de vérifier qu'un plasmide contient un gène de levure que l'on ne peut pas détecter ou sélectionner dans les bactéries : le succès de la transformation de la cellule de levure mutante prouvera que le plasmide porte bien le gène de levure désiré.

Si le plasmide 2μ sert de base au vecteur et que d'autres fragments d'ADN bactérien et de levure y sont attachés (figure 15-15b), on obtient une construction qui présente plusieurs propriétés utiles. D'abord, la partie 2μ confère la capacité de réplication autonome dans la levure, de sorte que l'intégration n'est plus nécessaire à l'obtention d'un phénotype transgénique stable. Ensuite, il est possible d'introduire des gènes dans la levure pour en étudier l'effet sur le phénotype, puis de retransférer le plasmide dans *E. coli* pour manipuler le gène de levure, pourvu qu'il contienne une origine de réplication bactérienne et un marqueur sélectionnable dans la bactérie. Ces **vecteurs navette** sont très utiles pour le clonage et la manipulation en routine des gènes de levure.

Un risque inhérent à l'utilisation de plasmides qui se répliquent de façon autonome est qu'une cellule fille n'hérite pas du plasmide à la mitose parce que la distribution des copies est essentiellement aléatoire et dépend donc de l'endroit de la cellule où se trouvent les plasmides lors de la formation de la nouvelle paroi cellulaire. Toutefois, si un fragment d'ADN de levure contenant un centromère est incorporé au plasmide (figure 15-15c), le fuseau mitotique qui assure la ségrégation équilibrée des chromosomes va manipuler le plasmide de la même façon et en assurer la répartition efficace entre les cellules filles à la division cellulaire. L'introduction d'un centromère constitue une première étape vers la construction d'un chromosome artificiel. Une étape supplémentaire a été franchie en linéarisant un plasmide contenant un centromère et en ajoutant des télomères à ses extrémités (figure 15-15d). Si on ajoute à cette construction des origines de réplication de levure (**des séquences de réplication autonomes** ou **ARS**, de l'anglais Autonomously Replicating Seqences), elle se comportera à de nombreux égards comme un petit chromosome de levure – un chromosome artificiel ou **YAC** (de l'anglais Yeast Artificial Chromosome) – à la mitose et à la méiose. Par exemple, lorsque deux cellules haploïdes dont l'une contient un chromosome artificiel trp^-ura^+ et l'autre un chromosome artificiel trp^+ura^- sont croisées pour produire une cellule diploïde, plusieurs tétrades issues de la méiose présenteront le profil de ségrégation attendu si ces deux éléments se comportent comme de véritables chromosomes. En d'autres termes, deux ascospores auront le génotype trp^-ura^+ et les deux autres, le génotype trp^+ura^-.

Applications des vecteurs de levure. Un des apports majeurs de l'analyse génétique est sa capacité à disséquer finement les processus biologiques grâce à l'isolement et à l'étude de bloquages introduits au niveau de gènes spécifiques et aux conclusions qui peuvent en être inférées. Traditionnellement, l'expérimentateur s'est servi de mutations produites de façon aléatoire. La mutagénèse in vitro a bouleversé l'ordre expérimental établi en permettant l'introduction de modifications dans des gènes déterminés et au niveau de sites spécifiques. Ces gènes mutagénisés in vitro peuvent être réintroduits dans l'organisme pour s'y substituer au gène de type sauvage résident et en étudier l'effet. Les plasmides d'intégration de levure (**YIP**, de l'anglais Yeast Integrative Plasmid) sont les vecteurs par excellence pour réaliser ce type d'analyse. Un gène *X* muté et les régions qui le flanquent, portés par un plasmide d'intégration, fournissent une région d'homologie avec le génome dans laquelle un crossing-over peut se produire, ce qui aboutit à l'intégration du plasmide tout entier dans un des chromosomes au locus étudié (figure 15-17). La présence de deux copies du gène en question (une mutée et une de type sauvage) sur un chromosome favorise un appariement qui boucle l'ADN intervenant de sorte qu'un autre crossing-over peut exciser le plasmide vecteur, porteur cette fois de l'allèle de type sauvage. L'allèle muté occupe à présent le locus chromosomique normal du gène *X*.

Sélection de la perte du plasmide. Dans certains cas, il est possible de sélectionner les cellules qui ont perdu le plasmide. Si, par exemple, le marqueur de sélection porté par le plasmide est $lys2^+$ et que le chromosome de la cellule réceptrice porte l'allèle $lys2^-$ (figure 15-17), l'insertion du plasmide produira une cellule contenant à la fois les allèles $lys2^+$ et $lys2^-$. L'α-aminoadipate empêche la croissance des cellules $lys2^+$. En présence de cette sub-

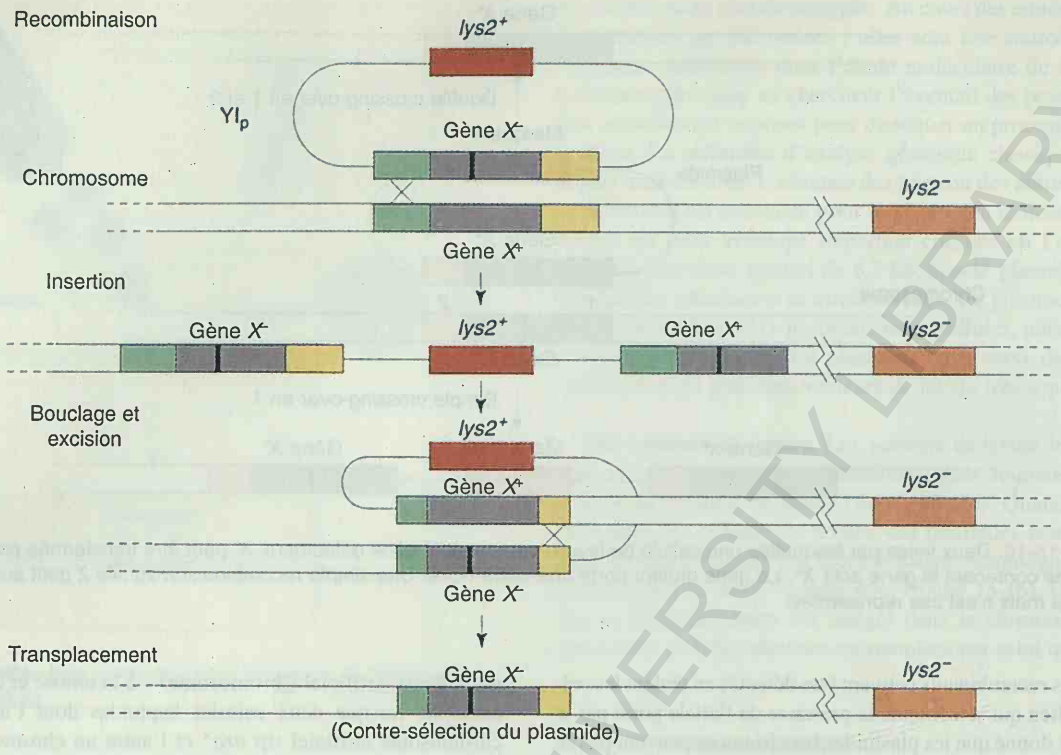


Figure 15-17. Méthode en deux étapes pour remplacer un gène sauvage X^+ par un allèle muté (X^-) déterminé dont on veut étudier le phénotype. L'allèle *lys2*$^+$ est un marqueur de levure qui peut être sélectionné grâce à la prototrophie qu'il confère à la cellule ou contre-sélectionné par l'adjonction d'α-aminoadipate au milieu de culture.

stance seules les cellules *lys2*$^-$, donc celles qui ont perdu le plasmide, pourront se développer. On constate que 50 % d'entre elles ont gardé l'allèle sauvage du gène cloné (le gène X^+) alors que les autres ont conservé l'allèle muté X^-. Il est aussi parfois possible de sélectionner directement les cellules X^- sur un milieu approprié.

Remarquez que le plasmide YIp porte deux segments d'ADN de levure : le gène *X* et le marqueur de sélection. Tous deux peuvent être le siège d'une recombinaison homologue avec le locus chromosomique qui leur correspond. Comme les extrémités d'ADN linéaire provoquent des recombinaisons, il est possible de diriger la recombinaison dans le gène *X* chromosomique en introduisant une coupure dans le gène *X* du plasmide par une enzyme de restriction (figure 15-18).

Interruption de gènes. Il se peut que l'on désire simplement inactiver le gène *X* que l'on étudie. Ceci peut être réalisé facilement en une étape: le gène sauvage cloné dans un plasmide peut être interrompu en y insérant un autre gène qui code pour une fonction sélectionnable. Cette construction peut ensuite être réintroduite dans le chromosome par recombinaison. En anglais, cette opération s'appelle **gene disruption** ou **gene knock out**.

Dans l'exemple présenté dans la figure 15-19, le gène *lys2*$^+$ porté par un plasmide a été mutagénisé par l'insertion du gène *his3*$^+$. Une forme linéaire du plasmide a ensuite été introduite par transformation dans une souche *lys2*$^+$ *his3*$^-$ et les transformants *his3*$^+$ ont été sélectionnés. Ceux-ci sont également *lys2*$^-$ puisqu'ils ont hérité dans leur chromosome de la copie interrompue du gène *lys2*$^+$ présente à l'origine sur le plasmide.

L'étude de la régulation. Les plasmides qui contiennent un centromère peuvent aussi être utilisés pour étudier les séquences régulatrices des gènes qui, pour la plupart, sont localisées du côté 5' de la séquence codante (figure 15-20). La région codante à étudier peut être clonée avec la région située en amont (en 5'), sur un plasmide qui porte en outre un marqueur de sélection, par exemple *URA3*. La région amont peut être manipulée in vitro. On peut par exemple y introduire différentes délétions en coupant l'ADN et en le traitant avec une exonucléase qui grignote les bases dans une direction seulement. L'ADN est ensuite refermé par traitement avec la ligase et introduit dans une cellule de levure dont le locus chromosomique correspondant au gène étudié n'est plus fonctionnel. On peut alors déterminer quelles sont les délétions qui peuvent encore assurer l'expression normale du gène porté par le plasmide. Si tout se passe bien, les résultats permettent de définir les segments spécifiques de la région en amont qui sont nécessaires à l'expression du gène et à sa régulation.

Dans ce type d'étude des mécanismes de régulation, il est souvent plus facile d'utiliser à la place du gène étudié ce que l'on appelle un gène indicateur, au phénotype plus aisé à détecter et à analyser que celui du gène *X*. Si l'on s'intéresse au gène *X*, sa séquence régulatrice peut être clonée en amont du gène rapporteur. Celui-ci sera maintenant exprimé et régulé comme le gène *X*. Le gène *lacZ* de *E.coli*, qui code pour la β-galactosidase, est le prototype du gène rapporteur et est aussi le plus utilisé. La fonction normale de cette enzyme est de métaboliser le lactose, mais elle peut aussi bien dégrader le *X-gal* (5-bromo-4-chloro-indolyl-β,D-galactoside), un analogue du lactose, en 5-bromo-4-chloro-indigo, qui

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

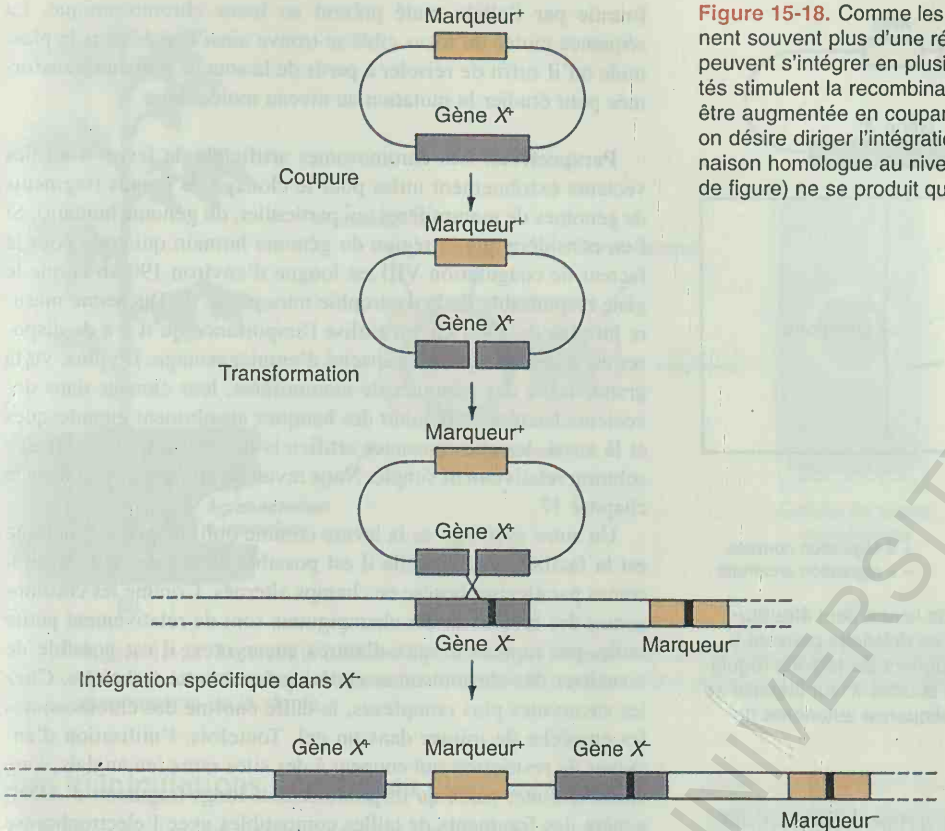
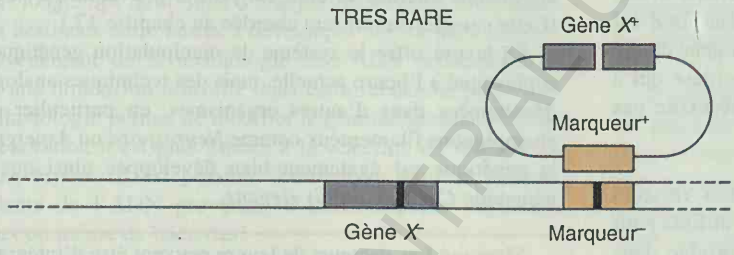


Figure 15-18. Comme les plasmides d'intégration de levure contiennent souvent plus d'une région d'homologie avec le chromosome, ils peuvent s'intégrer en plusieurs endroits. Chez la levure, les extrémités stimulent la recombinaison; la spécificité d'intégration peut donc être augmentée en coupant le plasmide dans la région vers laquelle on désire diriger l'intégration. En revanche, l'intégration par recombinaison homologue au niveau des marqueurs (représentée en bas de figure) ne se produit que très rarement.



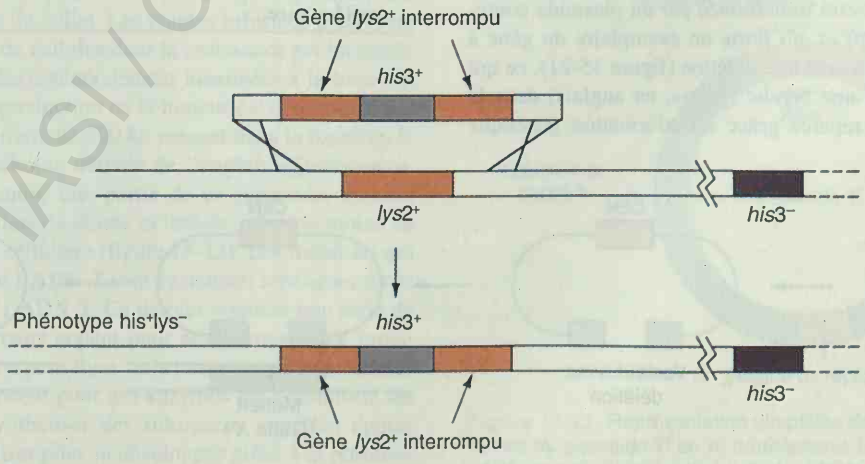


Figure 15-19. Une méthode en une étape pour remplacer un gène chromosomique par une copie interrompue (inactivée) par l'insertion d'un segment d'ADN. Dans le cas représenté ici, la sélection des cellules qui ont incorporé le gène interrompu repose sur le phénotype *his*+.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

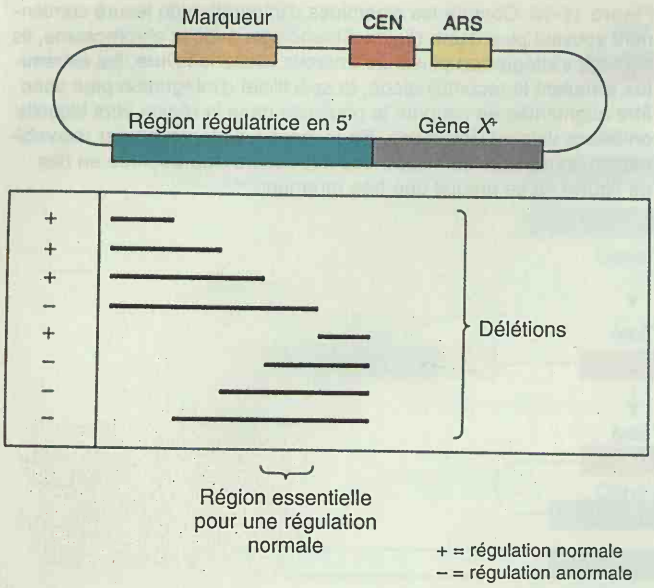


Figure 15-20. La régulation d'un gène X^+ de levure peut être étudiée en manipulant sa région régulatrice. Des délétions peuvent y être introduites in vitro. Les plasmides qui portent les régions régulatrices tronquées sont réintroduits dans une souche X^- sur laquelle se fait l'analyse. (CEN = centromère; ARS = séquence autonome de réplication.)

est bleu foncé. Une cellule de levure qui exprime la β-galactosidase sur un milieu qui contient du *X-gal* formera une colonie bleue. La fusion entre la région amont régulatrice et le gène *lacZ* est construite de manière à ce que les premiers codons du gène étudié se retrouvent en phase avec la partie de la β-galactosidase qui a l'activité enzymatique. Ce type de construction ne nécessite pas que le vecteur s'intégre dans le génome de levure.

Récupération de marqueurs sur un plasmide. Les vecteurs dotés de réplication autonome peuvent être également utilisés pour récupérer, sur le plasmide, une mutation isolée à l'origine dans l'organisme entier et qui présente un phénotype particulièrement intéressant. La structure et la fonction du gène muté peuvent alors être disséquées à partir de l'ADN plasmidique. Une cellule qui contient la mutation peut être transformée par un plasmide contenant un centromère (YCp) et qui porte un exemplaire du gène à récupérer dans lequel on a créé une délétion (figure 15-21), ce qui a pour effet d'introduire une brèche («gap», en anglais) dans le plasmide. La brèche est réparée grâce à l'information génétique fournie par l'allèle muté présent au locus chromosomique. La séquence mutée du locus ciblé se trouve ainsi copiée dans le plasmide qu'il suffit de réisoler à partir de la souche mutante transformée pour étudier la mutation au niveau moléculaire.

Perspectives. Les chromosomes artificiels de levure sont des vecteurs extrêmement utiles pour le clonage de grands fragments de génomes de mammifères (en particulier, du génome humain). Si l'on considère que la région du génome humain qui code pour le facteur de coagulation VIII est longue d'environ 190 kb et que le gène responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne mesure lui plus de 1000 kb, on réalise l'importance qu'il y a de disposer de vecteurs à grande capacité d'emmagasinage. De plus, vu la grande taille des génomes de mammifères, leur clonage dans des vecteurs bactériens requiert des banques absolument gigantesques et là aussi, les chromosomes artificiels de levure fournissent une solution relativement simple. Nous reviendrons sur ce sujet dans le chapitre 17.

Un autre avantage de la levure comme outil de génie génétique est la facilité avec laquelle il est possible de séparer les chromosomes par électrophorèse en champs alternés. Comme les chromosomes des levures et des champignons sont de relativement petite taille, par rapport à ceux d'autres eucaryotes, il est possible de visualiser des chromosomes entiers grâce à cette technique. Chez les eucaryotes plus complexes, la taille énorme des chromosomes les empêche de migrer dans un gel. Toutefois, l'utilisation d'enzymes de restriction qui coupent à des sites rares (en anglais, *long cutter enzymes* parce qu'ils produisent de longs fragments d'ADN) génère des fragments de tailles compatibles avec l'électrophorèse en champs alternés et dont les profils peuvent être caractérisés. (Cette caractérisation sera abordée au chapitre 17.)

La levure offre le système de manipulation génétique le plus sophistiqué à l'heure actuelle, mais des techniques analogues sont développées dans d'autres organismes, en particulier dans des champignons filamenteux comme *Neurospora* ou *Aspergillus* dont la génétique est également bien développée ainsi que dans le nématode *Caenorhabditis elegans*.

Message Les vecteurs de levure peuvent être d'intégration, à réplication autonome ou encore ressembler à des chromosomes artificiels. Ils permettent d'isoler, de manipuler, d'insérer ou de récupérer des gènes pour l'analyse génétique moléculaire.

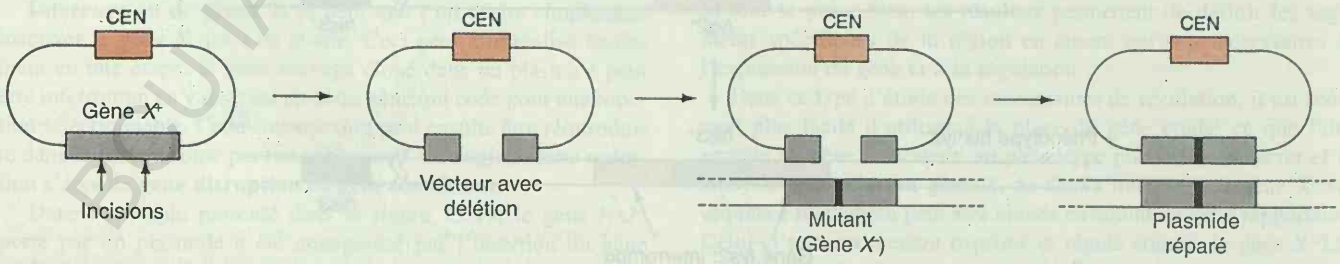


Figure 15-21. Un plasmide de levure qui contient un centromère et un gène dans lequel on a pratiqué une délétion peut être réparé par une synthèse d'ADN qui utilise la copie chromosomique homologue comme matrice. Ceci permet par exemple de transférer sur le plasmide une mutation chromosomique intéressante

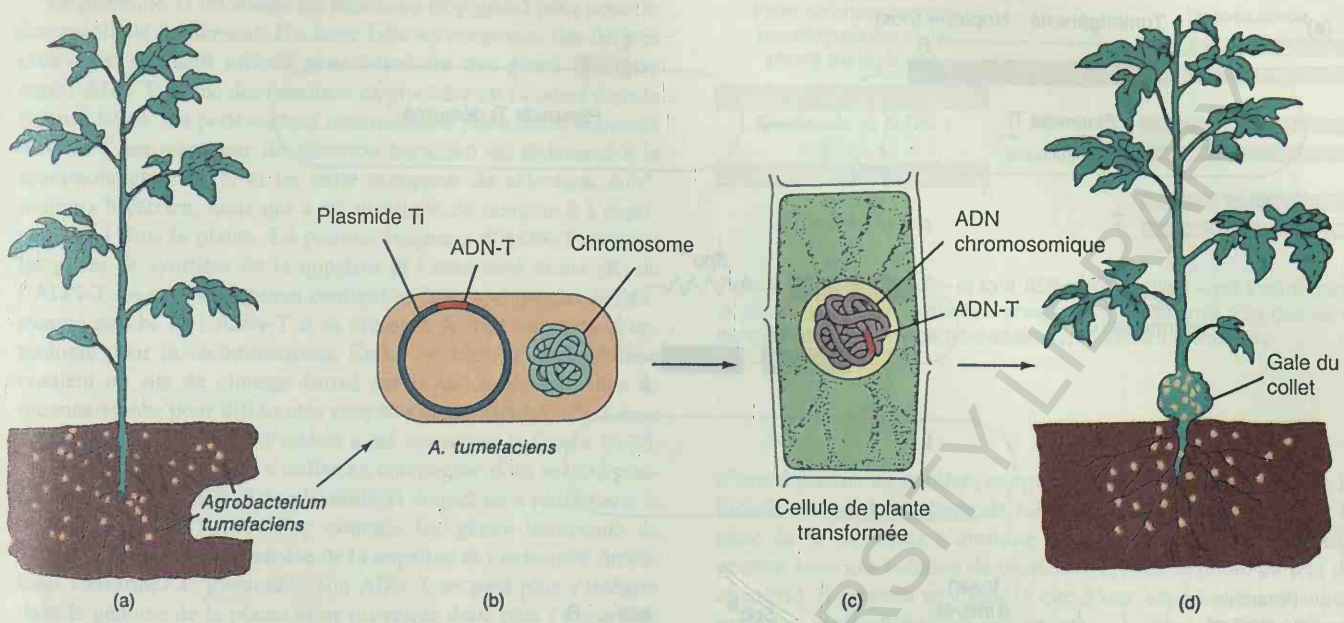


Figure 15-22. Lorsque la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* infecte une plante hôte, elle provoque une maladie appelée gale du collet. Le processus infectieux fait intervenir le transfert d'une partie du plasmide Ti, appelée ADN-T, de la bactérie dans le chromosome de la plante.

Les manipulations génétiques chez les plantes

A cause de leur importance économique majeure, les plantes ont depuis longtemps fait l'objet d'analyses génétiques et de manipulations destinées entre autres à développer des variétés améliorées. L'avènement de la technologie de l'ADN recombinant a introduit une dimension nouvelle dans cette recherche parce que cette méthodologie permet de modifier le génome presqu'à volonté. L'amélioration n'est plus limitée à la sélection de variants au sein d'une espèce. Il est possible d'introduire dans le génome d'une plante de l'ADN provenant d'autres espèces végétales, d'animaux ou même de bactéries!

Le plasmide Ti. Tous les vecteurs couramment utilisés dans les plantes sont dérivés d'une bactérie du sol appelée *Agrobacterium tumefaciens*. Celle-ci provoque chez les plantes qu'elle infecte une maladie du nom de gale du collet. Les plantes infectées présentent des lésions constituées de cellules dont la croissance est incontrôlée (des tumeurs ou gales), généralement localisées à la base (ou collet) de la plante. La production de la tumeur est déterminée par un grand plasmide circulaire de 200 kb présent dans la bactérie, le **plasmide Ti** (une appellation dérivée de l'anglais «Tumor-inducing»). Lors de l'infection, une partie de ce plasmide, appelée ADN-T, est transférée dans la plante et insérée, plus ou moins au hasard, dans le génome cellulaire (figure 15-22). Les fonctions qui contrôlent le transfert de l'ADN-T sont également localisées sur le plasmide, en dehors de l'ADN-T. Ce dernier contient une série de gènes intéressants. Certains codent pour des hormones de croissance végétales et sont responsables de la tumorisation des cellules de la plante; d'autres codent pour des enzymes qui conduisent les cellules tumorales à synthétiser des substances appelées opines que la bactérie peut utiliser pour se développer grâce à la présence d'autres gènes, localisés eux aussi sur le plasmide, mais en dehors de la région ADN-T. La nopaline et l'octopine sont deux opines importantes. A chacune d'elles correspond un type de plasmide Ti. La figure 15-23 décrit la structure d'un plasmide Ti. Notez que les gènes qui contrôlent la synthèse des hormones et des opines sont exprimés dans la plante à partir de séquences régulatrices typiquement eucaryotiques, alors que ceux qui contrôlent la synthèse des enzymes de dégradation des opines le sont dans la bactérie à partir de séquences régulatrices typiquement procaryotiques.

L'utilisation du plasmide Ti comme vecteur. Les propriétés du plasmide Ti le désignent tout naturellement comme vecteur pour la transformation des plantes. On peut en effet espérer que tout fragment d'ADN cloné au sein de l'ADN-T puisse comme lui s'intégrer de façon stable dans le génome de la plante qui le recevrait. Le système plante/bactérie a par conséquent été adapté à cette fin. Examinons un protocole expérimental typique.

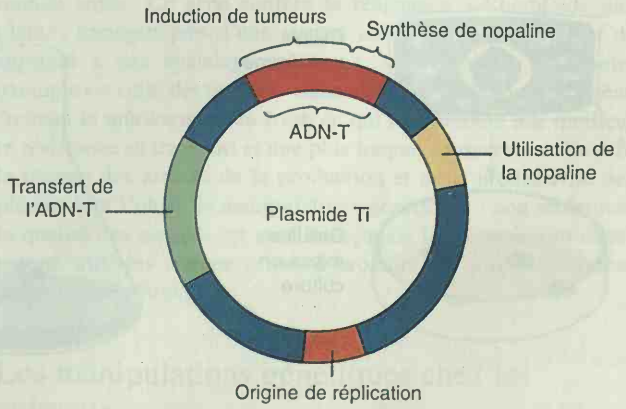
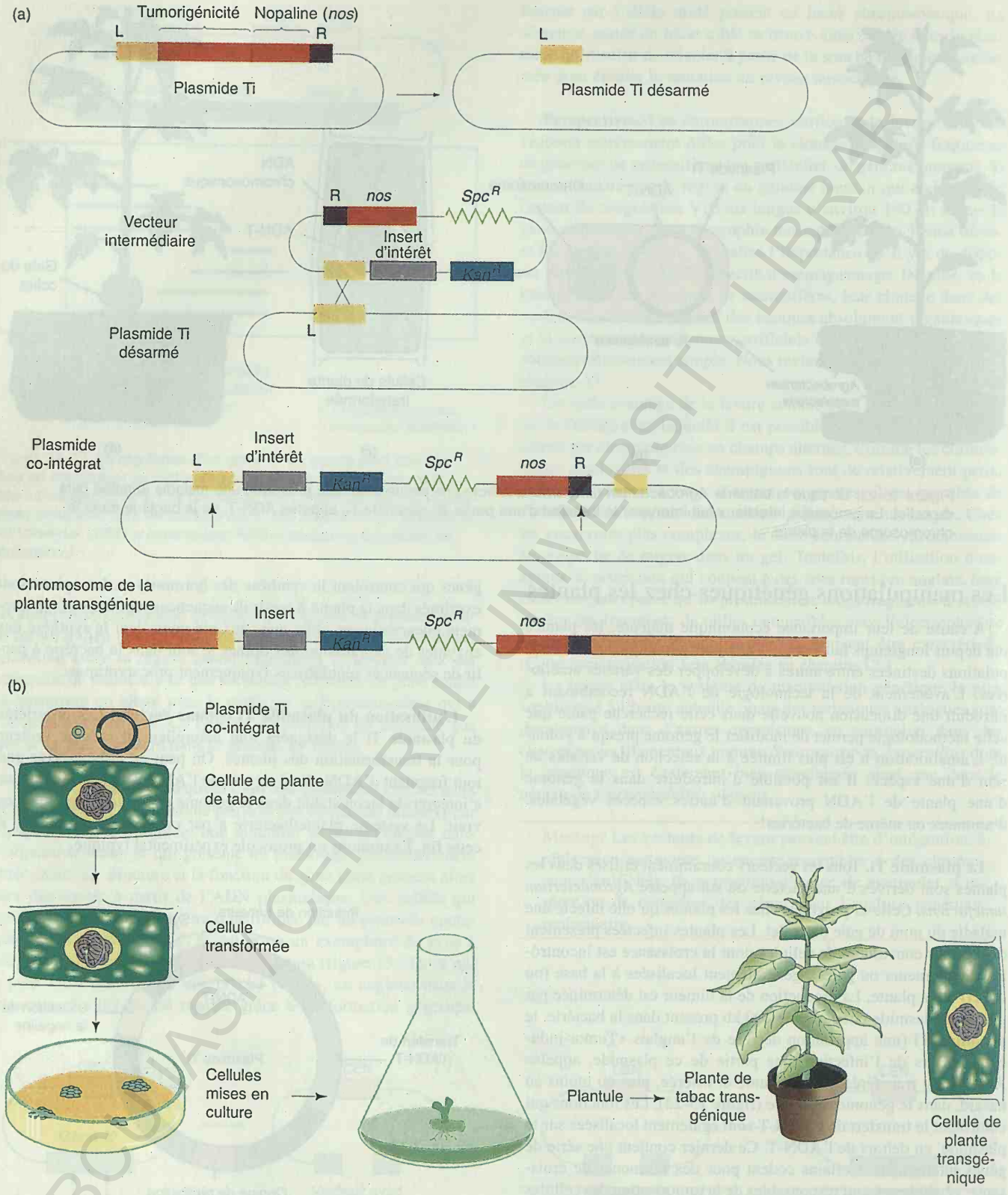


Figure 15-23. Représentation simplifiée des régions les plus importantes du plasmide Ti de *A. tumefaciens*. Lorsqu'il est inséré dans l'ADN chromosomique de la plante, l'ADN-T dirige la synthèse d'hormones végétales qui perturbent la régulation de la croissance des cellules infectées de la plante – ce qui donne lieu à la formation d'une tumeur – ainsi que la synthèse de nopaline qui peut être utilisée comme source de carbone et d'azote par la bactérie.



BOURJASIY CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 15-24. (a) Pour produire des plantes transgéniques, il est possible d'utiliser un vecteur intermédiaire dont la taille réduite facilite la manipulation. Dans la méthode décrite ici, le vecteur intermédiaire est ensuite inséré dans un plasmide Ti désarmé de manière à produire un co-intégrat qui contient, entre les extrémités de l'ADN-T, le segment d'ADN d'intérêt et un marqueur de sélection de résistance à la kanamycine utilisable dans la plante. Les extrémités de l'ADN-T sont les seules structures nécessaires à son transfert et à son intégration dans le génome végétal. (b) A partir des cellules transformées par l'ADN-T manipulé, il est possible de régénérer des plantes transgéniques.

Le plasmide Ti lui-même est beaucoup trop grand pour pouvoir être manipulé facilement. Il a donc fallu en construire des dérivés plus petits qui sont utilisés pour introduire des gènes étrangers dans l'ADN-T. L'une des manières de procéder est illustrée dans la figure 15-24a. Un petit vecteur intermédiaire porte deux segments d'ADN-T, un marqueur de sélection bactérien de résistance à la spectinomycine, *spc*^{R}, et un autre marqueur de sélection, *kan*^{R}, toujours bactérien, mais qui a été manipulé de manière à s'exprimer aussi dans la plante. Le premier fragment d'ADN-T contient les gènes de synthèse de la nopaline et l'extrémité droite (R) de l'ADN-T. Le second segment contient un fragment proche de l'extrémité gauche de l'ADN-T et sa présence fournit une zone d'homologie pour la recombinaison. Enfin, ce vecteur intermédiaire contient un site de clonage formé par la succession de sites de reconnaissance pour différentes enzymes de restriction. C'est dans cette région que l'ADN d'intérêt a été inséré sur la figure 15-25. Le vecteur intermédiaire s'utilise en compagnie d'un second plasmide, plus grand, dérivé du plasmide Ti duquel on a retiré toute la région droite de l'ADN-T y compris les gènes inducteurs de tumeurs, les gènes de synthèse de la nopaline et l'extrémité droite. Ceci «désarme» le plasmide : son ADN-T ne peut plus s'intégrer dans le génome de la plante et ne provoque donc plus l'apparition de tumeurs qui constituent l'aspect gênant de l'ADN-T. Le Ti désarmé conserve l'extrémité gauche (L) de l'ADN-T qui servira de site de recombinaison pour l'intégration du vecteur intermédiaire. Le vecteur intermédiaire est manipulé dans *E.coli*, puis transféré par conjugaison dans un *Agrobacterium* qui contient le second plasmide. Seul ce dernier peut se répliquer dans le deuxième hôte. En sélectionnant les dérivés résistants à la spectinomycine on obtiendra des *Agrobacterium* dont le plasmide Ti a incorporé le vecteur intermédiaire par recombinaison.

Les bactéries qui contiennent le plasmide résultant de la fusion du plasmide désarmé et du vecteur intermédiaire (que l'on appelle aussi un co-intégrat) peuvent être utilisées pour inoculer des fragments de tissu végétal, par exemple de petits disques de feuille préparés au moyen d'une perforatrice. Si l'infection par la bactérie réussit, son ADN-T sera transféré aux cellules végétales et tout l'ADN localisé entre les extrémités droite et gauche de l'ADN-T s'intégrera dans un chromosome de la plante. Si les disques de feuille sont ensuite placés sur un milieu nutritif qui contient de la kanamycine, seules les cellules qui contiennent l'ADN-T et par conséquent le marqueur de résistance à l'antibiotique, pourront se multiplier. La croissance de ces cellules donne lieu à la formation d'un petit amas ou **cal**, qui constitue en fait l'indication que les cellules de plantes ont été transformées. Les cals peuvent ensuite être traités de manière à produire des radicelles et des pousses qui pourront alors être mises en terre et grandir pour former une plante transgénique (figure 15-24b). Souvent, les cellules de ces plantes ne contiennent qu'une seule copie de l'ADN-T qui, à la méiose, ségrège comme un marqueur mendélien normal (figure 15-25). La présence de l'ADN-T peut être détectée par des expériences d'hybridation par la méthode de Southern, en utilisant une sonde constituée d'ADN-T marqué, ou par la présence de nopaline dans le tissu transgénique.

Expression de l'ADN intégré. Qu'en est-il de l'expression de l'ADN intégré en même temps que l'ADN T? Rappelons qu'il peut s'agir de n'importe quel ADN dont le chercheur veut tester l'expression et l'effet dans la plante utilisée comme hôte. Un exemple particulièrement frappant est celui du gène de la luciférase du ver luisant. Cette enzyme catalyse la réaction d'une substance appelée *luciférine* avec l'ATP; cette réaction s'accompagne

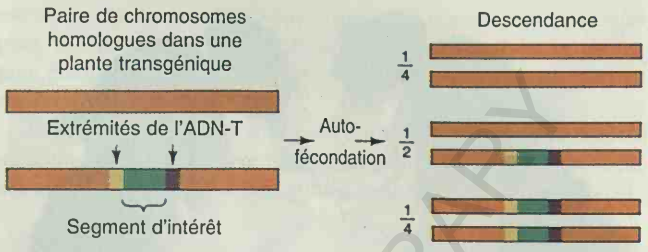


Figure 15-25. L'ADN-T – et tout ADN qu'il contient – est inséré dans un chromosome de la plante transgénique et transmis à sa descendance selon un schéma héréditaire typiquement mendélien.

d'une émission de lumière, ce qui explique la luminescence de la luciole en vol. Une plante de tabac transgénique qui exprime le gène de la luciférase s'illumine dans l'obscurité si on la badigeonne avec une solution de luciférine (voyez la photo en tête du chapitre). Il pourrait ne s'agir là que d'une expérience amusante, mais ses applications sont importantes : le gène de la luciférase peut être utilisé comme indicateur pour étudier, au cours du développement, la régulation de l'expression de l'un ou l'autre gène de la plante. On peut par exemple fusionner les séquences régulatrices localisées en amont de n'importe quel gène intéressant au gène de structure de la luciférase et réintroduire cette construction dans une plante en utilisant l'ADN-T. L'expression de la luciférase suivra alors le schéma d'expression du gène dont on a utilisé la séquence régulatrice. Cette expression sera facile à observer directement grâce à la lumière produite par l'enzyme dans les différents tissus de la plante.

D'autres gènes indicateurs utilisés dans les plantes sont le gène bactérien *gus* (codant pour la β-glucuronidase) qui produit une coloration bleue par hydrolyse du substrat chromogénique *X-gluc* et le gène bactérien *lacZ* (β–galactosidase) qui produit une coloration bleue par hydrolyse du *X-gal*.

Un exemple d'insertion d'ADN étranger dans les plantes, dont les retombées sont importantes dans le domaine de l'agriculture, est celui du gène bactérien de la résistance au glyphosate, une substance qui constitue la base d'un herbicide utilisé dans le monde entier. Ce gène confère la résistance à l'herbicide aux plantes transgéniques d'une variété utile, ce qui leur permet de survivre à des épandages normaux de glyphosate. Un autre exemple est celui des tomates «flavrsavr» qui contiennent un gène freinant le mûrissement du fruit, ce qui leur confère une meilleure résistance au transport et une plus longue conservation. En fait, la plupart des aspects de la production et de la productivité des plantes font l'objet de manipulations génétiques : non seulement la qualité des espèces est améliorée, mais les plantes sont elles-mêmes utilisées comme usines à produire des protéines codées par des gènes étrangers.

Les manipulations génétiques chez les animaux

Les animaux les plus utilisés comme systèmes modèles pour la manipulation de l'ADN sont *Caenorhabditis elegans* (un nématode), *Drosophila* et la Souris. Des versions légèrement adaptées des techniques décrites précédemment peuvent s'appliquer aussi à ces systèmes animaux.

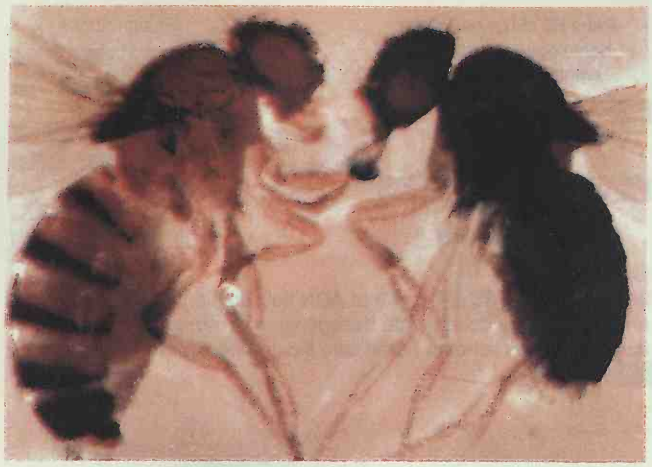


Figure 15-26. Une drosophile transgénique qui exprime le gène de la β–galactosidase bactérienne. *Drosophila* a été transformée avec une construction génétique associant le gène *lacZ* d'*Escherichia coli* et un promoteur activable par un choc thermique provenant de *Drosophila*. Les mouches transformées ont subi un choc thermique, puis elles ont été tuées et testées pour l'activité β–galactosidase en présence de *X-gal*. La galactosidase libère une substance de couleur indigo. La mouche transgénique (à droite) est montrée à côté d'une mouche normale. (John Lis)

Les animaux transgéniques. Plusieurs méthodes permettent d'isoler des animaux transgéniques. Deux exemples parmi les plus importants sont décrits ailleurs dans ce livre. Le premier est l'isolement de drosophiles transgéniques grâce à l'utilisation de l'élément P (décrite en détail au chapitre 21, page 652). Les drosophiles transgéniques nous fournissent un autre exemple de l'utilisation du gène *lacZ* bactérien comme gène indicateur pour l'étude de la régulation des gènes au cours du développement. Le gène *lacZ* peut être fusionné à la région régulatrice d'un gène dont l'expression est induite par un choc thermique. Cette construction peut ensuite être utilisée pour construire des mouches transgéniques. Après avoir été soumises à un choc thermique, ces mouches sont tuées et baignées dans une solution de X-gal (pages 470-472). La disposition des tissus colorés en bleu donne des informations quant à la localisation des sites d'action majeurs du produit du gène induit par la température (figure 15-26).

Un autre exemple est la production de mammifères transgéniques par l'injection de vecteurs dérivés de plasmides appropriés dans des œufs fécondés (voir plus loin dans ce chapitre). Dans les deux cas, l'ADN étranger se fraie un chemin jusqu'aux cellules germinales, passe à la descendance et se comporte alors plus ou moins comme un gène nucléaire normal. Comme les plantes, les animaux sont manipulés non seulement pour améliorer leurs qualités intrinsèques mais aussi pour produire des protéines étrangères. C'est ainsi que le lait des mammifères, facile à recueillir, constitue une source idéale pour la purification de certaines protéines qu'il serait difficile d' extraire à partir d'organes (figure 15-27).

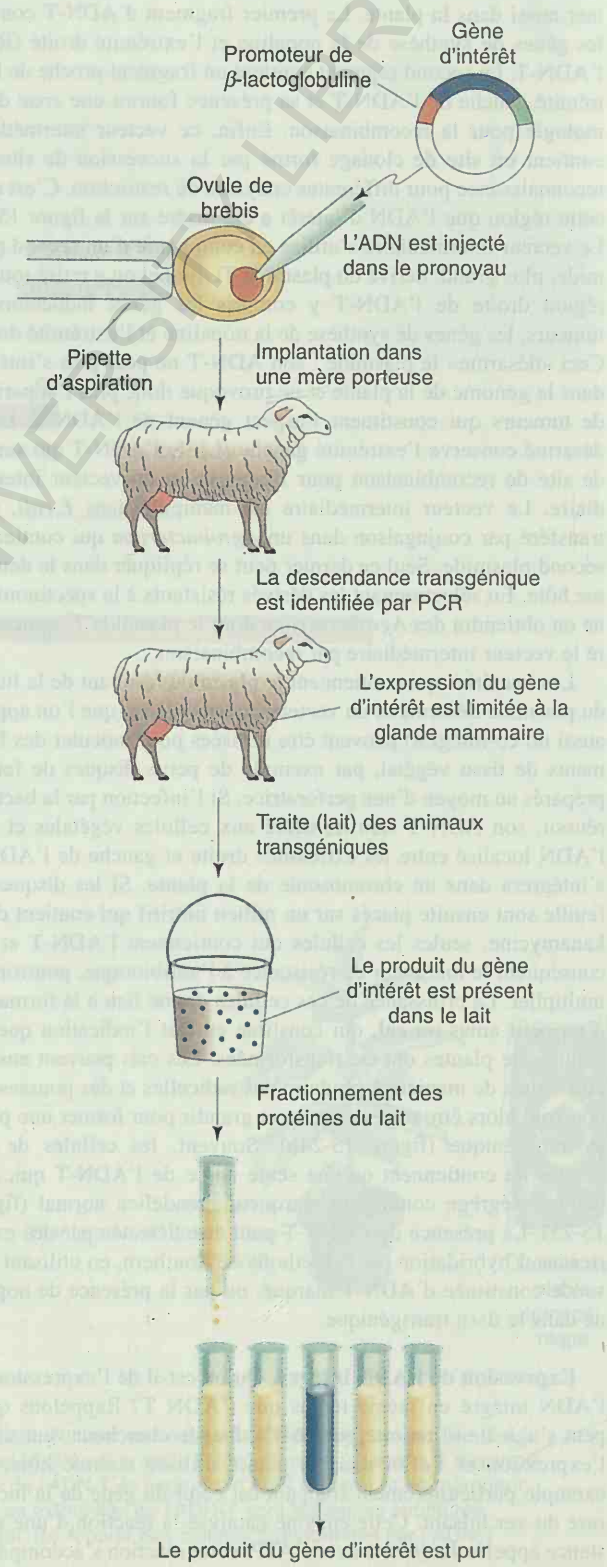


Figure 15-27. Une protéine dont les propriétés thérapeutiques intéressent l'industrie pharmaceutique est produite dans le lait de moutons transgéniques. Le gène en question code pour l'activateur tissulaire du plasminogène et sert à dissoudre les caillots sanguins chez l'être humain. Le gène est placé sous le contrôle du promoteur de la β–lactoglobuline, qui n'est actif que dans les tissus mammaires. Le vecteur d'expression est micro-injecté dans le pronoyau d'ovules de mouton. Les ovules injectés sont implantés dans des mères porteuses. Les descendants qui expriment le transgène sont identifiés par amplification PCR d'un segment d'ADN chromosomique, en utilisant des amorces correspondant à des séquences internes du gène d'intérêt. Les moutons transgéniques n'expriment ce gène que dans leur tissu mammaire et sécrètent des quantités importantes de la protéine correspondante dans leur lait à partir duquel elle peut être purifiée.

Interruption et transplacement de gènes chez la Souris. L'interruption de gènes chez la levure nous permet d'identifier la fonction des gènes en les remplaçant par des exemplaires mutés et en examinant le phénotype des organismes porteurs des gènes inactivés («knockout»). Les souris porteuses de gènes «knockout» constituent des modèles précieux pour l'étude de mutations similaires à des déficiences génétiques observées chez l'Homme. Par exemple, des souris «knockout» déficientes en enzymes cruciaux pour la réparation de l'ADN (voir Chapitre 19) ont été produites pour étudier l'incidence de ces mutations sur le taux d'apparition des cancers.

Les figures 15-28 et 15-29 décrivent la production de souris «knockout». Dans une première étape, un gène cloné interrompu est utilisé pour produire des cellules souches embryonnaires (cel-

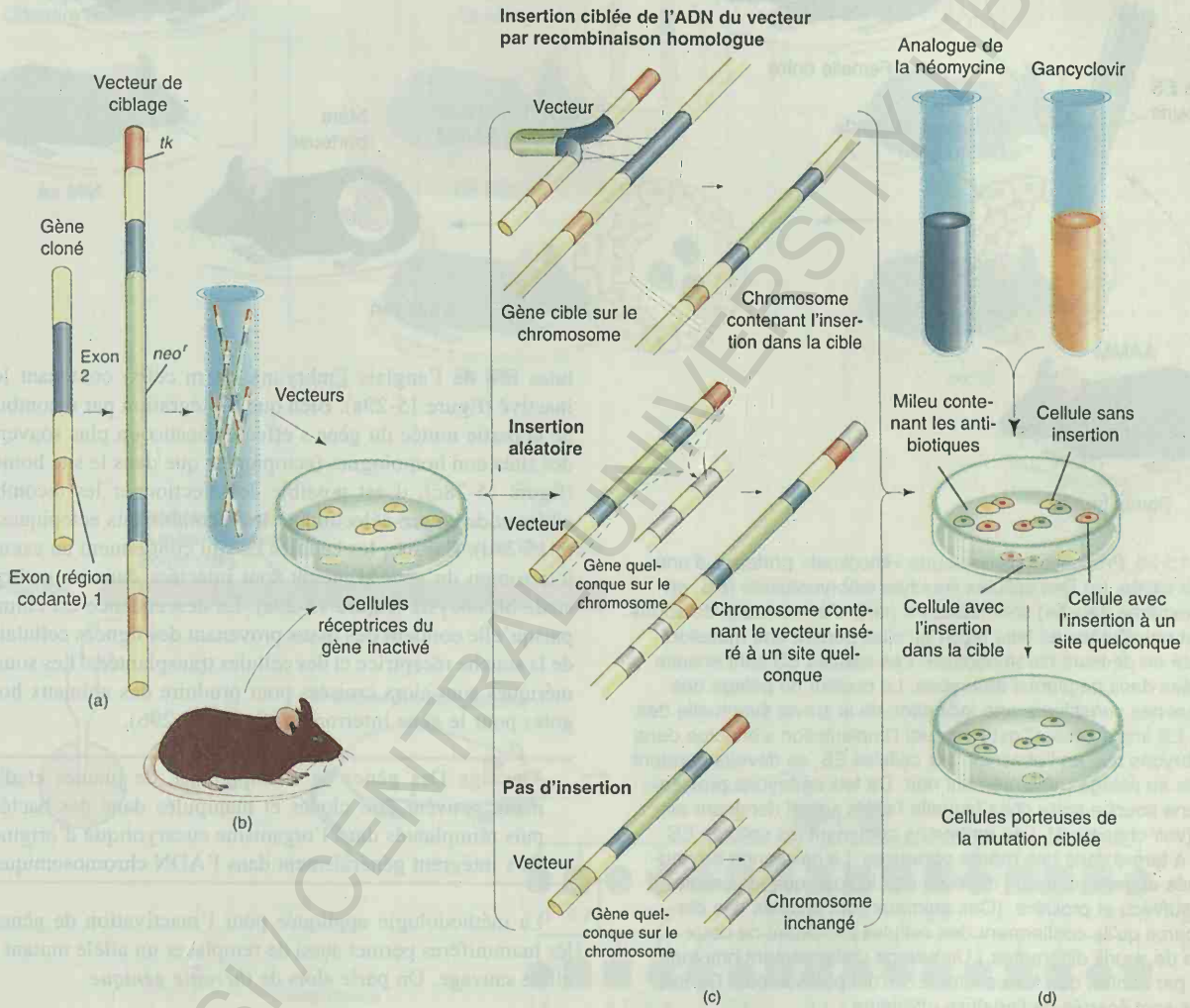


Figure 15-28. Production de cellules contenant une mutation dans un gène spécifique (mutation ciblée ou «knockout» de gène). (a) Un gène cloné est inactivé in vitro dans le vecteur de ciblage. Le gène en question est interrompu par l'insertion du gène *neo*^{r} (en vert) dans une région codante (en bleu). Le gène *neo*^{r} servira plus tard d'indicateur de la présence du vecteur intégré dans le chromosome. Le vecteur contient un second marqueur à une de ses extrémités : le gène *tk* du virus de l'herpès (en rouge). Ces marqueurs sont parmi les plus courants, mais d'autres gènes peuvent être utilisés à leur place. (b) Un vecteur porteur des deux marqueurs est introduit dans des cellules d'embryon de souris. (c) Dans le cas d'une recombinaison homologue (en haut), les régions bleues du vecteur (et tout ADN qu'elles flanquent) remplacent le gène original. Le marqueur rouge près d'une extrémité est perdu. Dans la majorité des cellules, le vecteur complet (y compris le marqueur inséré) s'intègre de façon aléatoire dans le génome (au milieu de l'image) ou ne s'intègre pas (bas de l'image). (d) L'isolement des cellules contenant le «knockout» désiré s'effectue sur un milieu contenant un antibiotique et un agent antiviral : du G418 – un analogue de la néomycine – et du gancyclovir. Le G418 tue les cellules qui ne contiennent pas de gène *neo*^{r} fonctionnel et élimine donc les cellules qui n'ont pas intégré le vecteur (en jaune). Le gancyclovir tue toutes les cellules qui contiennent un gène *tk* fonctionnel, éliminant ainsi les cellules contenant le vecteur intégré de façon aléatoire (en rouge). Par conséquent, les seules cellules qui prolifèrent sont celles qui contiennent l'insertion ciblée, le «knockout». (D'après M.R. Capecchi, «Targeted Gene Replacement.», *Scientific American*, Mars 1994.)

ASU / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

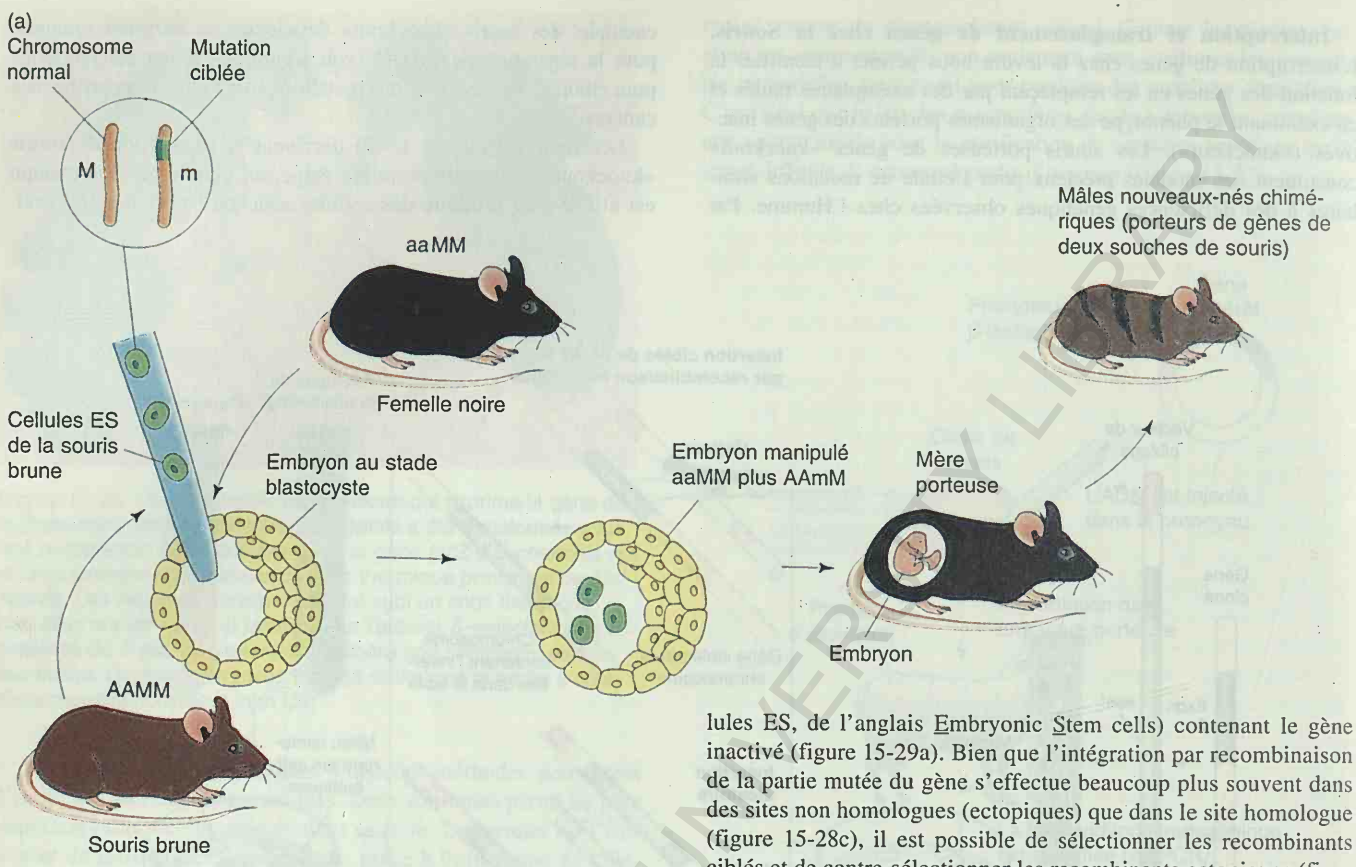


Figure 15-29. Production d'une souris «knockout» porteuse d'une mutation ciblée. (a) Des cellules souches embryonnaires (ES, en vert à l'extrême gauche) sont isolées à partir d'une souche de souris agouti et manipulées de telle façon qu'elles portent une mutation ciblée sur un de leurs chromosomes. Les cellules ES sont ensuite implantées dans de jeunes embryons. La couleur du pelage des nouveaux-nés constituera une indication de la survie éventuelle des cellules ES implantées. C'est pourquoi l'implantation s'effectue dans des embryons qui, en l'absence des cellules ES, se développeraient en souris au pelage uniformément noir. De tels embryons proviennent d'une souche noire chez laquelle l'allèle agouti dominant est absent (voir chapitre 4). Les embryons contenant les cellules ES arrivent à terme dans des mères porteuses. La naissance de nouveaux-nés au pelage agouti mêlé de noir indique que les cellules ES ont survécu et proliféré. (Ces animaux sont appelés des chimères parce qu'ils contiennent des cellules provenant de deux souches de souris différentes.) Un pelage uniformément noir indiquerait, par contre, que les cellules ES n'ont pas survécu. De tels individus sont écartés de l'analyse ultérieure.
(b) A désigne agouti, a désigne noir; m est la mutation ciblée et M l'allèle de type sauvage correspondant. Les mâles chimériques sont croisés avec des femelles noires (non-agouti). La descendance est criblée pour la présence de la mutation (en vert dans le médaillon) dans le gène cible. L'inspection directe des gènes des souris agouti indique les animaux qui ont hérité de la mutation (sur fond coloré). Ces souris sont croisées entre elles pour produire des animaux homozygotes pour la mutation (médaillon) qui sont donc déficients pour la fonction du gène cible. Le génotype de ces souris (sur fond coloré) est vérifié par analyse directe de leur ADN. L'inactivation du gène cible produit un phénotype de queue en tire-bouchon. (D'après M.R. Capecchi, «Targeted Gene Replacement.», *Scientific American*, Mars 1994.)

lules ES, de l'anglais Embryonic Stem cells) contenant le gène inactivé (figure 15-29a). Bien que l'intégration par recombinaison de la partie mutée du gène s'effectue beaucoup plus souvent dans des sites non homologues (ectopiques) que dans le site homologue (figure 15-28c), il est possible de sélectionner les recombinants ciblés et de contre-sélectionner les recombinants ectopiques (figure 15-28d). Ensuite, les cellules ES qui contiennent un exemplaire interrompu du gène d'intérêt sont injectées dans un embryon au stade blastocyste (figure 15-29a). La descendance est chimérique puisqu'elle contient des tissus provenant des lignées cellulaires ES de la souche réceptrice et des cellules transplantées. Les souris chimériques sont alors croisées pour produire des animaux homozygotes pour le gène interrompu (figure 15-29b).

Message Des gènes de champignons, de plantes et d'animaux peuvent être clonés et manipulés dans des bactéries, puis réimplantés dans l'organisme eucaryotique d'origine où ils s'intègrent généralement dans l'ADN chromosomique.

La méthodologie appliquée pour l'inactivation de gènes chez les mammifères permet aussi de remplacer un allèle mutant par un allèle sauvage. On parle alors de *thérapie génique*.

La thérapie génique

La thérapie génique est une application qui découle tout naturellement de l'isolement d'animaux (ou d'autres organismes) transgéniques. L'approche générale constitue une extension de la technique de sélection de clones par complémentation fonctionnelle (Chapitre 14). La technique consiste à apporter les fonctions d'un gène déficient chez l'organisme récepteur sur un vecteur qui s'insère dans le génome et exprime cette fonction dans l'animal transgénique qui est ainsi guéri génétiquement. Il est du plus haut intérêt d'appliquer cette technologie à l'Homme puisqu'elle offre la possibilité de corriger certaines maladies génétiques. Toutefois, la thérapie génique s'applique aussi chez d'autres animaux que l'Homme.

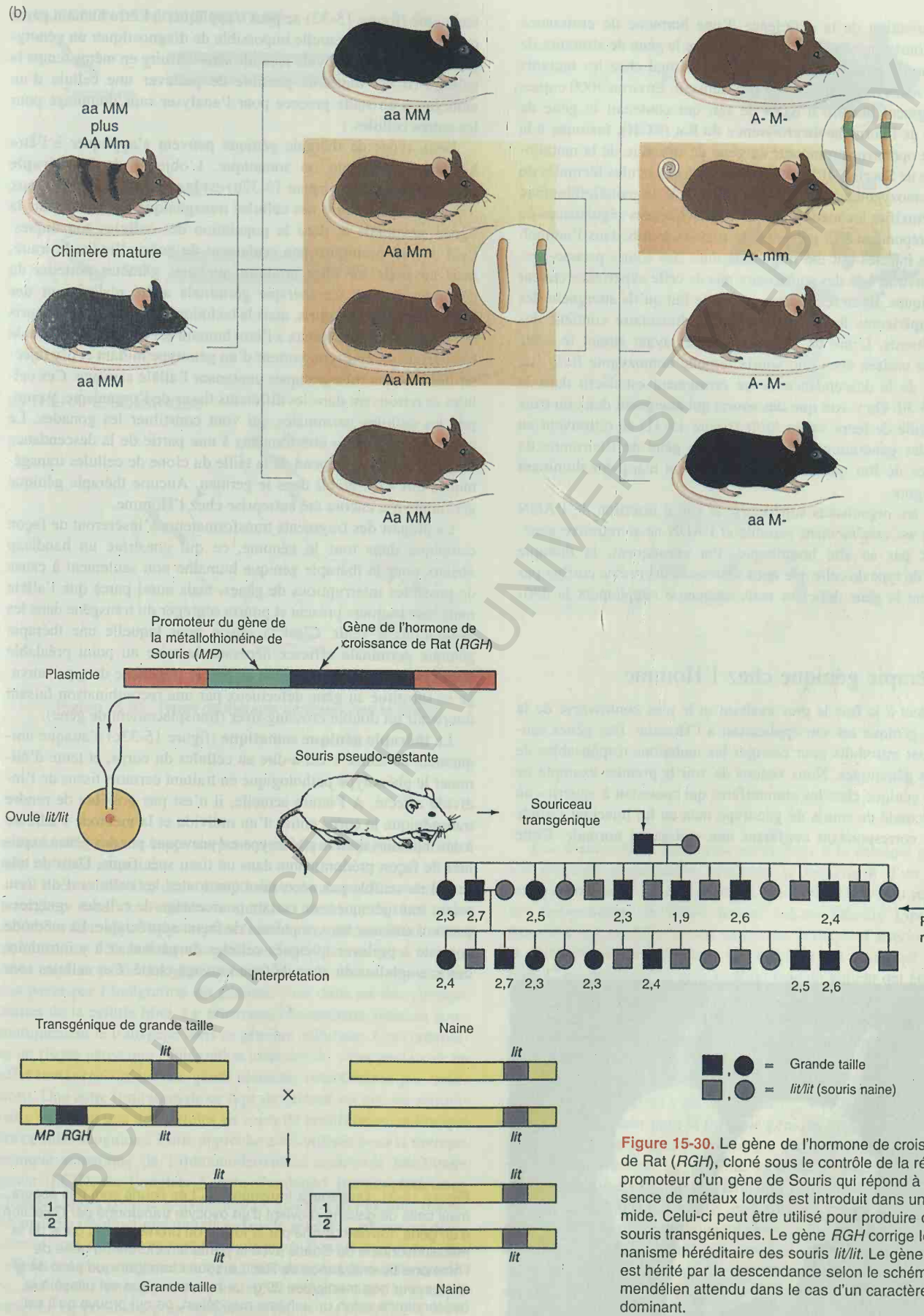


Figure 15-30. Le gène de l'hormone de croissance de Rat (*RGH*), cloné sous le contrôle de la région promoteur d'un gène de Souris qui répond à la présence de métaux lourds est introduit dans un plasmide. Celui-ci peut être utilisé pour produire des souris transgéniques. Le gène *RGH* corrige le nanisme héréditaire des souris *lit/lit*. Le gène *RGH* est hérité par la descendance selon le schéma mendélien attendu dans le cas d'un caractère dominant.

BCU LAUSANNE / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La correction de la déficience d'une hormone de croissance chez la Souris en est un exemple. Bien que le gène de structure de l'hormone de croissance soit présent et normal chez les mutants récessifs nains *little (lit),* il n'est pas transcrit. Environ 5000 copies d'un fragment linéaire d'ADN de rat, qui contenait le gène de structure de l'hormone de croissance du Rat (RGH), fusionné à la séquence opérateur-promoteur du gène de structure de la métallothionéine de Souris (MP), ont été injectés à des ovules fécondés de souris homozygotes *lit/lit.* Le rôle normal de la métallothionéine est de détoxifier les métaux lourds ; les séquences régulatrices de ce gène répondent à la présence de métaux lourds dans l'animal. Les œufs injectés ont été implantés dans des souris pseudo-gestantes. Environ 1 % des souriceaux nés de cette expérience étaient transgéniques. Ils se reconnaissent par le fait qu'ils atteignent des tailles supérieures lorsque leur régime alimentaire contient des métaux lourds. L'une de ces souris mâles ayant atteint le stade adulte fut croisée avec une souris femelle homozygote *lit/lit.* Le pedigree de la descendance de ce croisement est décrit dans la figure 15-30. On y voit que des souris qui atteignent deux ou trois fois la taille de leurs sœurs *lit/lit* (figure 15-31) se retrouvent au travers des générations. Elles portent le gène de l'hormone de croissance de Rat qui s'exprime comme un marqueur dominant hétérozygote.

Chez les organismes supérieurs, le site d'insertion de l'ADN introduit est extrêmement variable et l'ADN ne se retrouve généralement pas au site homologue. Par conséquent, la thérapie génique du type de celle que nous venons de décrire ne corrige pas réellement le gène déficient mais compense simplement la déficience.

La thérapie génique chez l'Homme

L'aspect à la fois le plus exaltant et le plus controversé de la thérapie génique est son application à l'Homme. Des gènes sauvages sont introduits pour corriger les mutations responsables de maladies génétiques. Nous venons de voir le premier example de thérapie génique chez les mammifères qui consistait à «guérir» un ovule fécondé de souris de génotype nain en lui injectant l'allèle sauvage correspondant conférant une croissance normale. Cette technique (figure 15-32) ne peut s'appliquer à l'être humain parce qu'il est à l'heure actuelle impossible de diagnostiquer un génotype déficient dans un ovule fécondé sans détruire en même temps la cellule. (Il est toutefois possible de prélever une cellule d'un embryon à un stade précoce pour l'analyser sans dommage pour les autres cellules.)

Deux types de thérapie génique peuvent s'appliquer à l'être humain : germinale ou somatique. L'objectif de la **thérapie génique germinale** (figure 15-32b) est le plus ambitieux des deux : il s'agit d'introduire des cellules transgéniques à la fois dans la lignée germinale et dans la population des cellules somatiques. Ceci devrait permettre non seulement de guérir l'individu traité, mais aussi de lui faire produire quelques gamètes porteurs du génotype corrigé. La thérapie germinale a été réalisée sur des ovules fécondés de souris, mais la technique utilisée chez la Souris qui s'appliquerait le mieux à l'être humain est de prélever au stade blastocyste un embryon porteur d'un génotype mutant et d'y injecter des cellules transgéniques contenant l'allèle sauvage. Ces cellules se retrouvent dans les différents tissus de l'organisme, y compris les cellules germinales qui vont constituer les gonades. Le transgène peut donc être transmis à une partie de la descendance dont l'importance dépend de la taille du clone de cellules transgéniques qui s'est établi dans le germen. Aucune thérapie génique germinale n'a encore été entreprise chez l'Homme.

La plupart des fragments transformateurs s'insèreront de façon ectopique dans tout le génome, ce qui constitue un handicap sérieux pour la thérapie génique humaine non seulement à cause de possibles interruptions de gènes, mais aussi parce que l'allèle muté sera toujours présent et pourra ségréger du transgène dans les générations à venir. C'est la raison pour laquelle une thérapie génique germinale efficace nécessite la mise au point préalable d'un système de ciblage grâce auquel le transgène de type sauvage se substitue au gène défectueux par une recombinaison faisant intervenir un double crossing-over (transplacement de gène).

La **thérapie génique somatique** (figure 15-33c) s'attaque uniquement au soma, c'est-à-dire au cellules du corps, et tente d'éliminer le phénotype pathologique en traitant certains tissus de l'individu affecté. A l'heure actuelle, il n'est pas possible de rendre transgénique le corps entier d'un individu et la méthode s'adresse à des maladies dont le phénotype est provoqué par des gènes exprimés de façon prédominante dans un tissu spécifique. Dans de tels cas, il ne semble pas nécessaire que toutes les cellules d'un tissu soient transgéniques; un certain pourcentage de cellules «guéries» peuvent atténuer les symptômes de façon appréciable. La méthode consiste à prélever quelques cellules du patient et à y introduire des exemplaires du gène de type sauvage cloné. Ces cellules sont

Figure 15-31. Une souris transgénique. Les souris sont des soeurs, mais celle de gauche provient d'un ovocyte transformé par l'injection d'un gène nouveau formé par la fusion du promoteur du gène de la métallothionéine de Souris avec la partie structurale du gène de l'hormone de croissance de Rat. La souris transgénique pèse 44 g et sa soeur non manipulée 29 g. Le nouveau gène est passé à la descendance selon un schéma mendélien, ce qui prouve qu'il est intégré dans un chromosome. (R.L. Brinster)

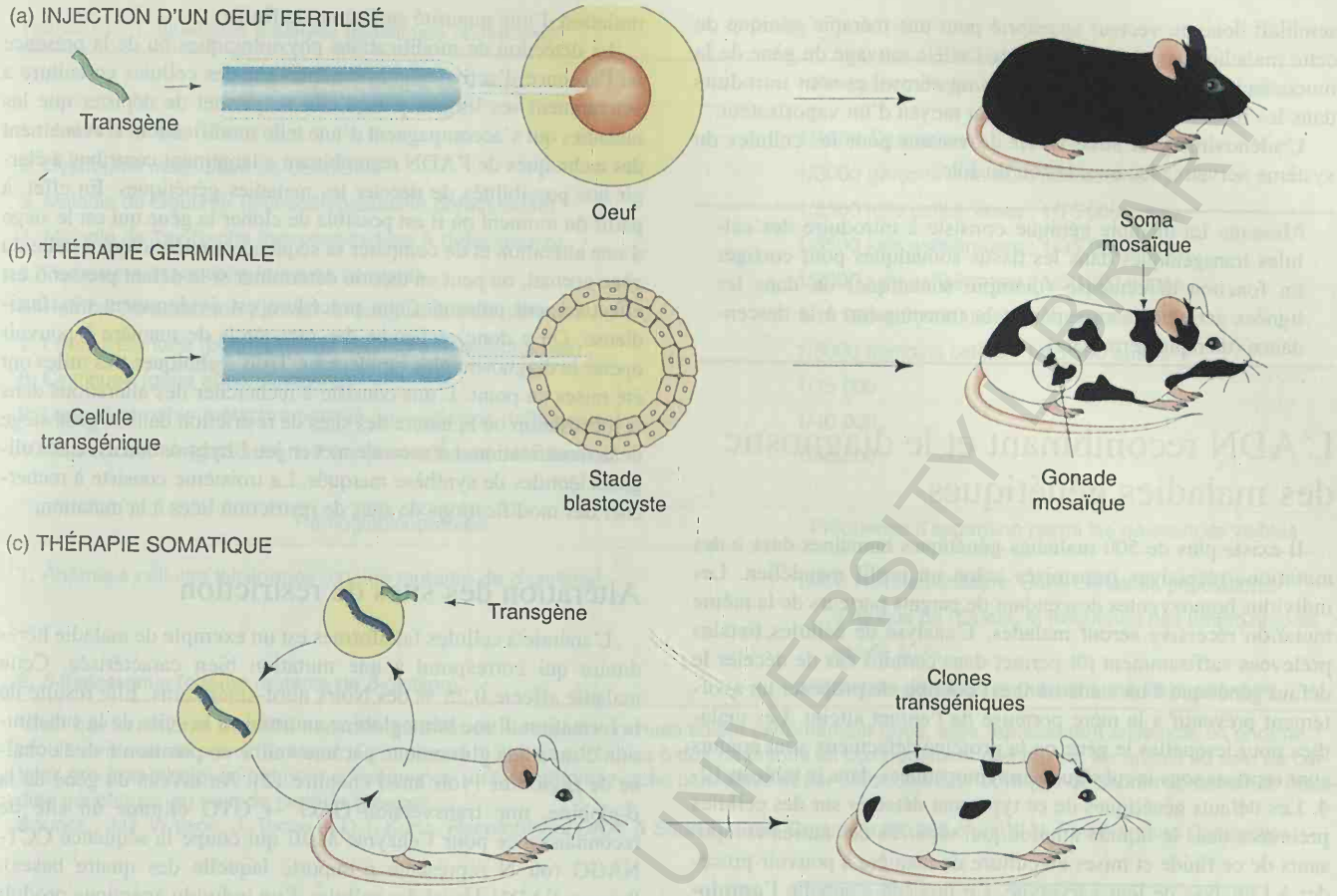


Figure 15-32. Types de thérapie génique chez la Souris

réimplantées dans le corps du patient où elles remplissent la fonction normale attendue.

A l'heure actuelle, deux procédures permettent d'introduire un transgène dans des cellules somatiques déficientes. Les deux méthodes font appel à des vecteurs viraux. La plus ancienne utilise un rétrovirus désarmé dans le génome duquel le transgène remplace la majeure partie des gènes viraux. Le cycle naturel des rétrovirus passe par l'intégration du génome viral dans un des chromosomes de la cellule hôte. Le rétrovirus recombinant insèrera automatiquement le transgène dans le génome cellulaire. Ceci comporte un risque parce que l'intégration aléatoire du virus peut avoir un effet mutagène sur un des gènes résidents (inactivation par insertion). Une autre limitation de ce type de vecteur est que les rétrovirus n'infectent que des cellules en cours de prolifération, telles que les cellules sanguines. Cette approche a été utilisée pour la thérapie génique somatique de l'immunodéficience combinée héréditaire grave (SCID, de l'anglais Severe Combined Immunodeficiency Disease), aussi connue sous le nom de *maladie des enfants-bulles*. La maladie résulte d'une mutation dans le gène de l'adénosine désaminase, une enzyme présente dans le sang. Pour le traitement, des cellules souches sanguines ont été prélevées dans la moelle épinière, ont reçu le transgène, puis ont été introduites dans le système sanguin. Le pronostic pour les patients traités est favorable.

Les tissus solides sont aussi accessibles à la thérapie génique. Un exemple remarquable concerne le traitement d'un patient homozygote pour un allèle mutant récessif ($LDLR^-$) du récepteur des lipoprotéines de faible densité («Low Density Lipoprotein Receptor»). Cet allèle mutant augmente le risque d'artériosclérose et d'affections coronariennes. Le récepteur est synthétisé dans le foie. C'est pourquoi 15 pour cent du foie du patient ont été prélevés et les cellules dispersées infectées avec un rétrovirus porteur de l'allèle $LDLR^+$. Les cellules ont été réintroduites dans le corps du patient par injection dans la veine porte qui achemine le sang de l'intestin vers le foie. Les cellules transgéniques se sont fixées dans le foie. Aux dernières nouvelles, la thérapie semble agir et le profil lipidique du patient s'est amélioré.

Un autre vecteur pour la thérapie génique humaine est l'adénovirus. Ce virus s'attaque normalement aux cellules épithéliales du système respiratoire. Le génome viral ne s'intègre pas dans le génome, mais se maintient en situation extrachromosomique dans les cellules infectées. Cette particularité résout le problème d'éventuelles mutagénèses insertionnelles par le vecteur. Un autre avantage lié à l'utilisation d'adénovirus est que ce virus attaque aussi les cellules en état de non-prolifération. Tous les tissus sont donc en principe accessibles à ce vecteur. La mucoviscidose est une affection de l'épithélium du tractus respiratoire et l'adénovirus

semblait donc un vecteur approprié pour une thérapie génique de cette maladie. Des virus porteurs de l'allèle sauvage du gène de la mucoviscidose sont incorporés dans un aérosol et sont introduits dans les fosses nasales des patients au moyen d'un vaporisateur.

L'adénovirus peut aussi servir de vecteur pour les cellules du système nerveux, des muscles ou du foie.

Message La thérapie génique consiste à introduire des cellules transgéniques dans les tissus somatiques pour corriger un fonction défectueuse (thérapie somatique) ou dans les lignées germinales en espérant la transmission à la descendance (thérapie germinale).

L'ADN recombinant et le diagnostic des maladies génétiques

Il existe plus de 500 maladies génétiques humaines dues à des mutations récessives transmises selon un profil mendélien. Les individus homozygotes descendant de parents porteurs de la même mutation récessive seront malades. L'analyse de cellules fœtales prélevées suffisamment tôt permet dans certains cas de déceler le défaut génétique à un stade où il est possible de proposer un avortement préventif à la mère porteuse de l'enfant atteint. Les maladies pour lesquelles le gène ou la protéine défectueux sont connus sont reprises sous la rubrique «enzymopathies» dans le tableau 12-4. Les défauts génétiques de ce type sont détectés sur des cellules prélevées dans le liquide amniotique, séparées des autres composants de ce fluide et mises en culture de manière à pouvoir procéder à l'analyse de leur caryotype. Ce procédé s'appelle l'**amniocentèse** (figure 15-33). Il permet de déceler une série de maladies connues dont quelques exemples sont repris dans le tableau 15-1. Le **prélèvement de villosités chorioniques** est une technique apparentée dans laquelle un petit échantillon de cellules placentaires est prélevé au moyen d'une longue seringue. Cette technique peut être utilisée plus tôt que l'amniocentèse qui nécessite l'accumulation d'une quantité suffisante de fluide.

La détection de modifications physiologiques ou de la présence ou l'absence d'activités enzymatiques sur des cellules en culture a évidemment ses limites puisqu'elle ne permet de dépister que les maladies qui s'accompagnent d'une telle modification. L'avènement des techniques de l'ADN recombinant a largement contribué à élargir nos possibilités de déceler les maladies génétiques. En effet, à partir du moment où il est possible de cloner le gène qui est le siège d'une altération et de comparer sa séquence nucléotidique à celle du gène normal, on peut en théorie déterminer si le défaut pressenti est effectivement présent. Cette procédure est évidemment très fastidieuse. On a donc recherché des raccourcis de manière à pouvoir opérer le diagnostic plus rapidement. Trois techniques très utiles ont été mises au point. L'une consiste à rechercher des altérations dans la localisation ou la nature des sites de restriction dans le gène siège de la modification. La seconde met en jeu l'hybridation avec des oligonucléotides de synthèse marqués. La troisième consiste à rechercher des modifications de sites de restriction liées à la mutation.

Altération des sites de restriction

L'anémie à cellules falciformes est un exemple de maladie héréditaire qui correspond à une mutation bien caractérisée. Cette maladie affecte 0,25 % des Noirs nord-américains. Elle résulte de la formation d'une hémoglobine anormale à la suite de la substitution d'un acide glutamique par une valine en position 6 de la chaîne de β-globine (voir aussi chapitre 12). Au niveau du gène de la β-globine, une transversion GAG → GTG élimine un site de reconnaissance pour l'enzyme *Mst*II qui coupe la séquence CCTNAGG (où N représente n'importe laquelle des quatre bases). Puisque l'ADN dérivé des cellules d'un individu anémique produit un fragment d'ADN de moins que l'ADN de cellules normales, le changement de CCTGAGG en CCTGTGG pourra être détecté par hybridation sur un transfert Southern en utilisant un ADNc de β-globine marqué comme sonde (figure 15-34).

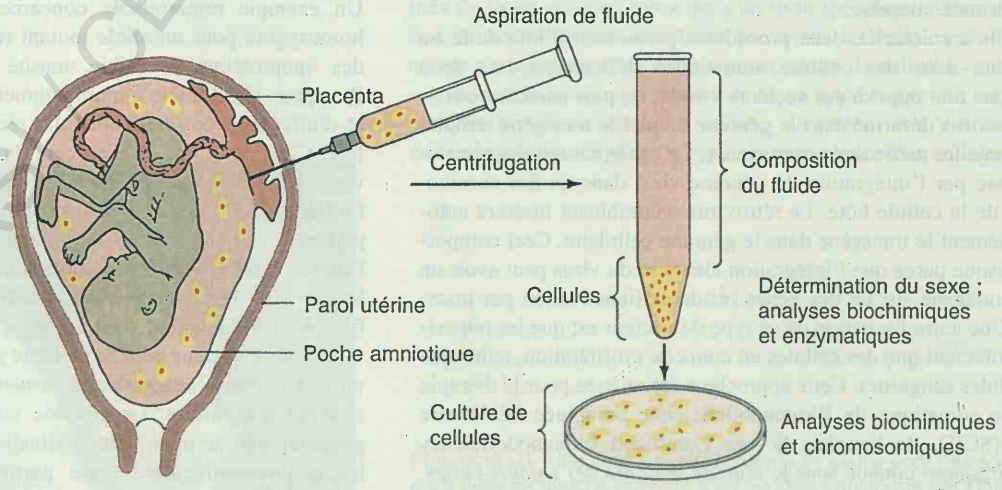


Figure 15-33. L'amniocentèse.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA

Tableau 15-1. Quelques maladies génétiques communes*

Enzymopathie	Fréquence d'apparition parmi les naissances viables
1. Mucoviscidose	1/1600 Caucasiens
2. Dystrophie musculaire de Duchenne	1/3000 garçons (liée au chromosome X)
3. Maladie de Gaucher (glucocérébrosidase défectueuse)	1/2500 juifs ashkénazes ; 1/75 000 autres
4. Maladie de Tay-Sachs (hexosaminidase A défectueuse)	1/3500 juifs ashkénazes ; 1/35 000 autres.
5. Pentosurie essentielle (maladie bénigne)	1/2000 juifs ashkénazes ; 1/50 000 autres
6. Hémophilie classique (facteur de coagulation VIII défectueux)	1/10 000 garçons (liée au chromosome X)
7. Phénylcétonurie (phénylalanine hydroxylase défectueuse)	1/5000 Irlandais celtes ; 1/15 000 autres
8. Cystinurie (gène affecté inconnu)	1/15 000
9. Leucodystrophie métachromatique (arylsulfatase défectueuse)	1/40 000
10. Galactosémie (galactose 1-P uridyl transférase défectueuse)	1/40 000
Hémoglobinopathies	**Fréquence d'apparition parmi les naissances viables**
1. Anémie à cellules falciformes (chaîne mutante de β-globine)	1/400 Noirs américains. Dans certaines populations d'Afrique de l'Ouest, la fréquence des hétérozygotes est de 40 %.
2. β-thalassémie (chaîne mutante de β-globine)	1/400 dans certaines populations méditerranéennes

*Bien que la majorité des 500 maladies génétiques récessives connues soient extrêmement rares, elles représentent ensemble un énorme problème de santé pour l'humanité. Comme ces maladies sont dues à des mutations au comportement mendélien, les unions au sein de certains groupes ethniques ont pour conséquence un taux d'homozygotie plus élevé et par conséquent, une fréquence accrue de certaines maladies génétiques au sein de certains groupes.

SOURCE : J.D. Watson, J. Tooze et D.T. Kurtz, *Recombinant DNA: A Short Course.* Copyright © 1983 chez W.H. Freeman and Company.

Sondage des séquences modifiées

Lorsqu'une maladie génétique est toujours associée à la même modification de la séquence des nucléotides, il est possible de synthétiser un oligonucléotide qui permet de détecter cette modification. Le meilleur exemple de ce type est une déficience en alpha-1-antitrypsine, responsable d'une propension accrue des individus atteints au développement d'un emphysème pulmonaire ; elle résulte de la modification d'une seule paire de bases en une position connue. L'utilisation d'un oligonucléotide contenant la séquence sauvage de la région en question dans une analyse par hybridation avec un transfert Southern permet de déterminer si l'ADN étudié contient ou non la modification. Il est en effet possible de trouver des conditions de température (plus élevée) dans lesquelles l'oligonucléotide s'hybride avec la séquence complémentaire mais pas avec la séquence qui n'en diffère que par une base.

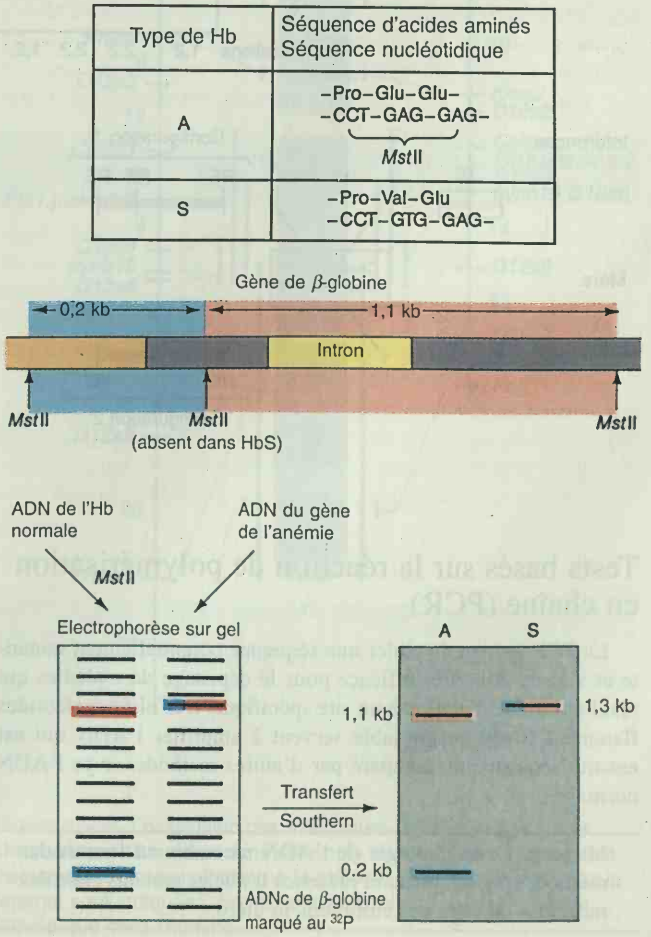


Figure 15-34. Utilisation de la technique du transfert à la Southern pour détecter le gène de globine responsable de l'anémie à cellules falciformes. Ce gène porte une mutation due au remplacement d'une adénine par une thymine, qui élimine un site de restriction *Mst* II présent dans le gène de globine sauvage. Ce changement peut être détecté par hybridation. (D'après J.D. Watson, J. Tooze et D.T. Kurtz, *Recombinant DNA : A Short Course.* Copyright © 1983 chez W.H. Freeman and Company.)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

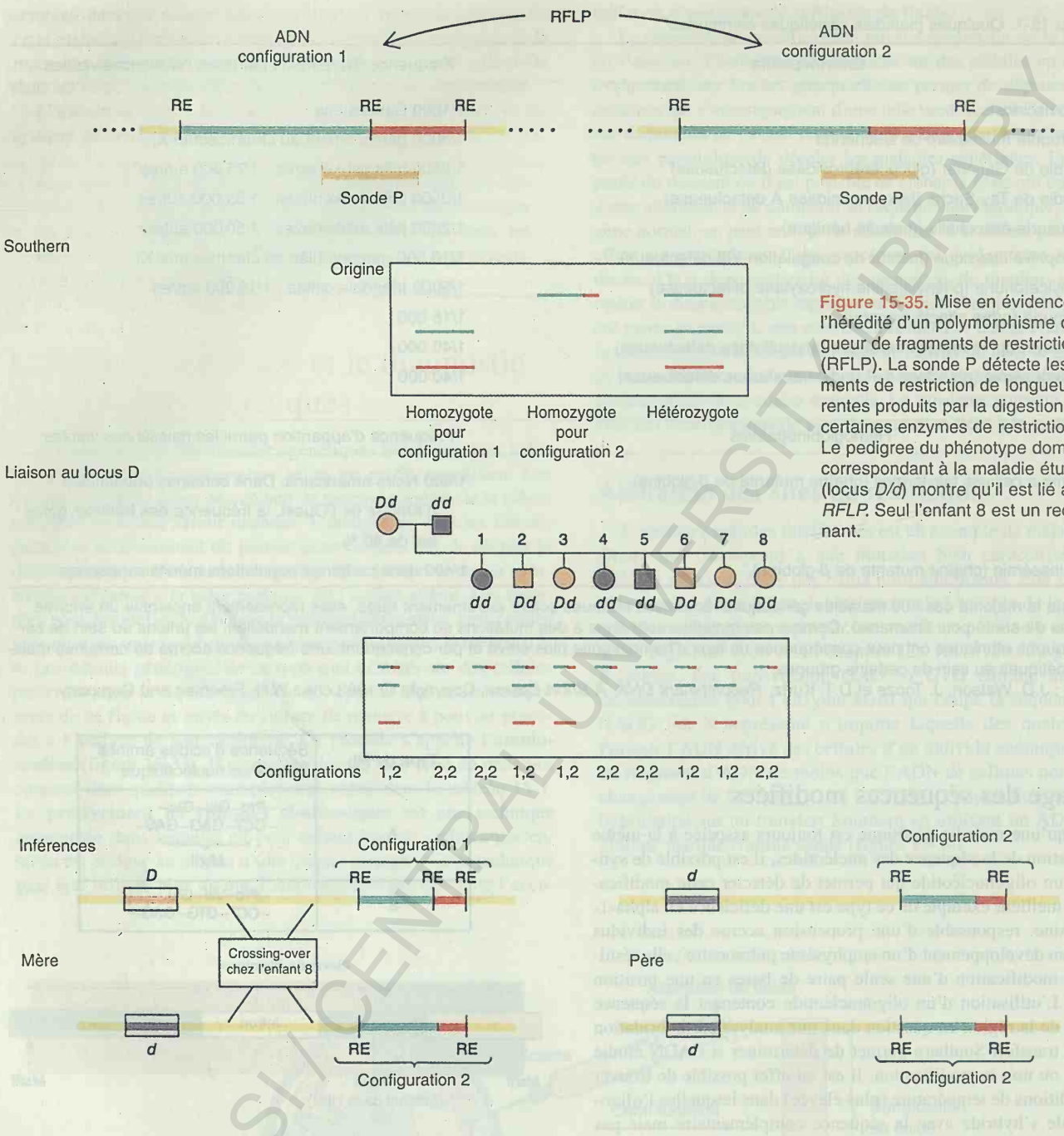


Figure 15-35. Mise en évidence de l'hérédité d'un polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP). La sonde P détecte les fragments de restriction de longueurs différentes produits par la digestion par certaines enzymes de restriction (RE). Le pedigree du phénotype dominant D correspondant à la maladie étudiée (locus *D/d*) montre qu'il est lié au locus *RFLP*. Seul l'enfant 8 est un recombinant.

Tests basés sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR permet de cibler une séquence potentiellement mutante et s'avère donc très efficace pour le dépistage de maladies qui résultent d'une mutation à un site spécifique. Des oligonucléotides flanquant le site responsable servent à amplifier l'ADN qui est ensuite séquencé ou comparé par d'autres méthodes avec l'ADN normal.

Message La technologie de l'ADN recombinant fournit des méthodes pour dépister la présence d'allèles mutants chez des individus ou chez des embryons in utero.

Liaison à des sites de restriction modifiés

Comment procéder lorsque le défaut génétique ne correspond pas à une modification décelable ? Il est parfois possible de mesurer la liaison à un site de restriction qui, lui, est modifié. Cette stratégie dérive de l'observation suivante : lorsque l'on clone et que l'on détermine la séquence nucléotidique d'une région génétique particulière chez différents individus, on constate qu'il existe entre les différents ADN homologues un petit pourcentage de nucléotides différents. Ceci est dû entre autres à la dégénérescence du code génétique. Mais quelle qu'en soit la raison, cette différence fait parfois apparaître ou disparaître un ou plusieurs sites de restriction dans la séquence concernée. Dans les ADN eucaryotiques,

RCJIASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

on identifie en fait relativement fréquemment de telles différences en utilisant le protocole expérimental qui suit.

La plupart des segments clonés d'ADN humain, par exemple, lorsqu'ils sont utilisés comme sondes pour détecter des sites de restriction, permettent de mettre en évidence des variations du nombre de ces sites. Prenons un fragment quelconque d'ADN et utilisons-le dans une hybridation à la Southern avec des préparations d'ADN provenant d'un échantillon d'individus et digérées par une enzyme de restriction. Si nous n'avons pas de chance, nous verrons le même profil de distribution de fragments sur toutes les préparations : une bande d'hybridation ou plusieurs selon que l'enzyme utilisée coupe ou non à l'intérieur de la région que nous analysons. Mais il est fort probable que nous trouvions un variant, c'est-à-dire un profil de distribution de fragments différent des autres qui reflète la présence, dans l'ADN de l'individu correspondant, d'un site de restriction localisé à une position différente (figure 15-35).

Ces variations dans la position des sites de restriction sont le plus souvent neutres : elles ne correspondent à aucune modification décelable au niveau fonctionnel. Mais elles représentent un nouveau type de marqueurs chromosomiques qui sont d'une très grande utilité pour caractériser et manipuler les grands génomes. La coexistence au sein d'une population de deux phénotypes, ou plus, attribuables le plus souvent à la présence de deux allèles (ou plus) du même gène s'appelle le **polymorphisme** (du grec : multiforme). La coexistence au sein d'une population de deux ou plusieurs profils de restriction s'appelle **polymorphisme de la longueur des fragments de restriction** (**RFLP,** de l'anglais «Restriction Fragment Length Polymorphism»). Les marqueurs RFLP les plus utiles sont ceux qui se rencontrent le plus fréquemment. On peut les utiliser pour rechercher une liaison avec un phénotype particulier, par exemple une maladie génétique, comme illustré sur la figure 15-35. (Comme les autres marqueurs génétiques, les loci RFLP peuvent aussi être localisés les uns par rapport aux autres.)

La figure 15-36 illustre une autre application de cette méthode. Un polymorphisme de site *Hpa*I est fortement lié au gène de la β-globine qui est modifié dans les cas d'anémie à cellules falciformes. L'étude de la liaison de cet allèle avec un changement de site de restriction revient en fait à effectuer sur l'ADN le même genre d'analyse que nous appliquions jusqu'ici aux organismes entiers et qui consistait à utiliser la liaison d'un marqueur génétique que l'on veut caractériser plus avant à un caractère identifiable. Nous avons vu par exemple dans le problème 32 du chapitre 5 comment l'on peut exploiter le daltonisme pour avoir plus d'information sur la nature du locus responsable de l'hémophilie. Le locus du daltonisme (*Cb*) est proche de celui de l'hémophilie (*Hb*) sur le chromosome X. Si l'on connaît le génotype des parents, il est donc possible de mesurer la probabilité de trouver l'allèle *Hb* chez un individu daltonien. L'exemple illustré dans la figure 15-36 repose sur le même principe. Simplement, au lieu d'utiliser le daltonisme, nous utilisons la présence de sites de restriction sur l'ADN.

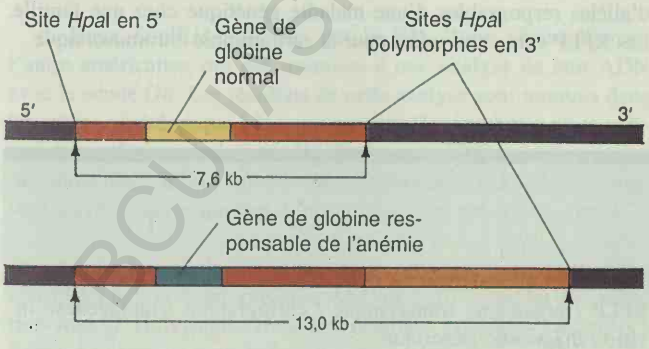


Figure 15-36. Le polymorphisme des fragments produits par l'enzyme *Hpa*I sert de diagnostic du gène de β-globine humaine responsable de l'anémie à cellules falciformes.

L'utilisation de marqueurs RFLP comme points de repère pour la localisation de marqueurs a été tellement utile qu'il existe actuellement une carte de ces marqueurs pour l'entièreté du génome humain (voyez par exemple la carte RFLP du chromosome 12 dans la figure 15-37). Pour le généticien qui désire étudier et clo-

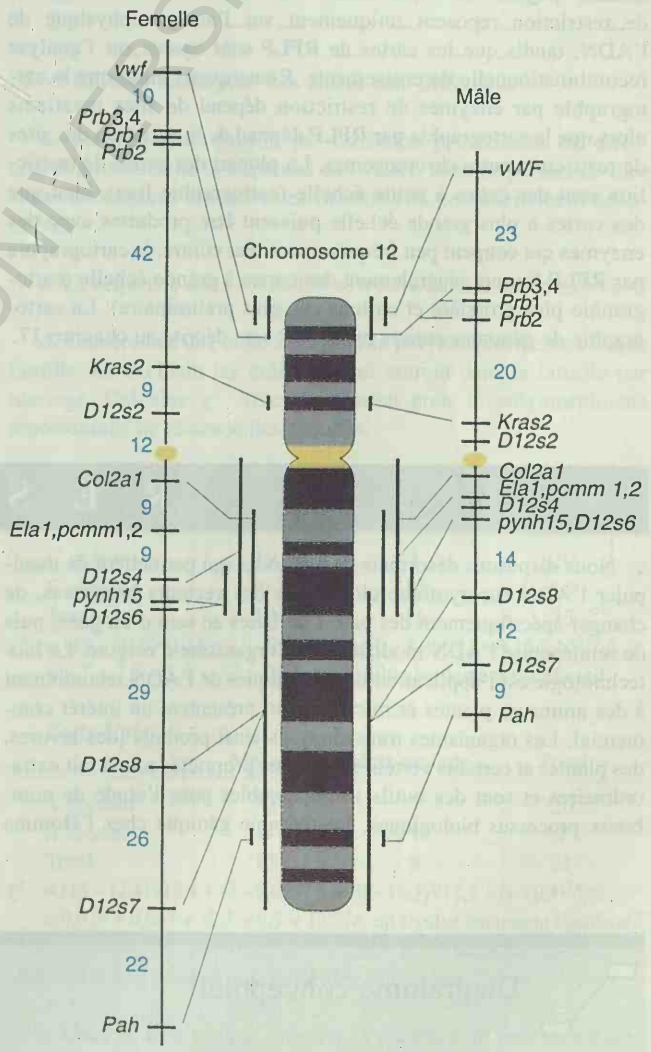


Figure 15-37. Localisation des marqueurs *RFLP* détectés sur le chromosome 12 humain dans différents arbres généalogiques. Les fréquences de recombinaison à la méiose, chez l'homme et chez la femme, sont indiquées. Notez qu'elles sont plus élevées chez la femme que chez l'homme.

ner le gène responsable d'une maladie génétique, le fait de trouver un marqueur RFLP lié à ce gène est déjà une étape décisive. Si ce marqueur est à moins d'une unité de cartographie (1 u.c. = ± 1000 kb) du gène recherché, il peut être utilisé comme point de départ pour une marche sur le chromosome (Chapitre 17) qui se terminera par l'isolement du gène responsable de la maladie.

Nous avons considéré ici des marqueurs RFLP simples, en fait, des cas de dimorphisme. Mais il existe des sondes qui peuvent révéler plusieurs allèles. La famille reprise sur la figure 15-38 illustre une situation de ce type.

Message Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) fournit des marqueurs hétérozygotes en général neutres pour la cartographie génétique et pour le diagnostic d'allèles liés, responsables de maladies génétiques dans certaines familles humaines.

Il est intéressant de comparer la construction d'une carte de restriction (pages 449-451) et celle d'une carte de RFLP. Les cartes de restriction reposent uniquement sur l'analyse physique de l'ADN, tandis que les cartes de RFLP sont basées sur l'analyse recombinationnelle de croisements. Remarquons aussi que la cartographie par enzymes de restriction dépend de sites invariants alors que la cartographie par RFLP dépend de la variation des sites de restriction entre chromosomes. La plupart des cartes de restriction sont des cartes à petite échelle (cartographie fine), bien que des cartes à plus grande échelle puissent être produites avec des enzymes qui coupent peu fréquemment. Par contre, la cartographie par RFLP fournit généralement des cartes à grande échelle (cartographie plus grossière et en tous cas plus préliminaire). La cartographie de génomes entiers par RFLP sera décrite au chapitre 17.

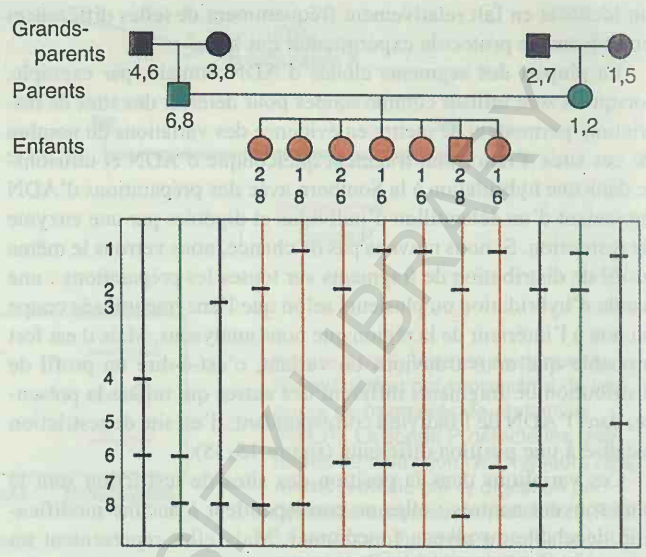


Figure 15-38. Généalogie illustrant l'hérédité d'un locus *RFLP* comportant un VNTR (répétitions en tandem en nombres variables). Dans le cas de ce polymorphisme, une séquence spécifique est répétée un nombre variable de fois entre deux sites de restriction. Il ne s'agit donc pas à proprement parler d'une variation *au niveau* des sites, mais la longueur des fragments va dépendre du nombre de répétitions présentes. L'autoradiogramme présenté en dessous de l'arbre généalogique montre les fragments de restriction qui s'hybrident avec une sonde VNTR chez les individus de trois générations successives. Cette famille contient huit allèles différents, c'est-à-dire, huit fragments de longueurs différentes à ce locus.

RÉSUMÉ

Nous disposons désormais de méthodes qui permettent de manipuler l'ADN eucaryotique cloné dans des vecteurs bactériens, de changer spécifiquement des paires de bases au sein d'un gène, puis de réintroduire l'ADN modifié dans l'organisme d'origine. La biotechnologie est l'application des techniques de l'ADN recombinant à des animaux, plantes et microbes qui présentent un intérêt commercial. Les organismes transgéniques ainsi produits (des levures, des plantes et certains vertébrés) ont des propriétés tout à fait extraordinaires et sont des outils irremplaçables pour l'étude de nombreux processus biologiques. La thérapie génique chez l'Homme est une application particulière de la technologie de la transgénèse : la thérapie germinale tente d'introduire des cellules transgéniques dans la lignée germinale pour qu'elles soient transmises à la descendance et la thérapie somatique introduit des cellules modifiées génétiquement dans le corps d'un individu. L'amniocentèse et le prélèvement de villosités chorioniques sont complétés par les techniques de l'ADN recombinant pour poser des diagnostics génétiques. La liaison à un RFLP permet souvent le dépistage rapide d'allèles responsables d'une maladie génétique chez une famille. Les RFLP sont aussi utiles pour la cartographie chromosomique.

Diagramme conceptuel

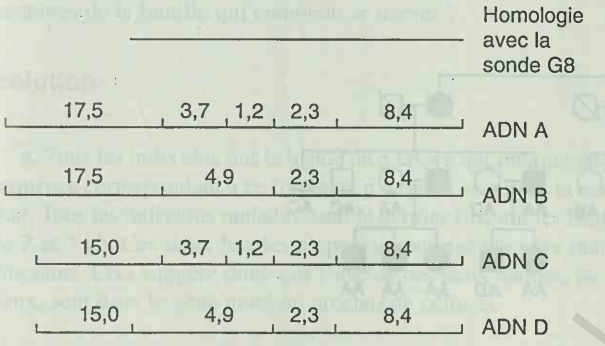
Dessinez un diagramme conceptuel qui relie entre eux le plus grand nombre possible des termes suivants. Remarquez que les termes ne sont pas présentés dans un ordre particulier.

ADN recombinant / sonde / hybridation in situ / thérapie génique / RFLP / organisme transgénique / cartographie / mutagénèse in vitro / diagnostic génétique

SCUIA - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Dans le chapitre 2, nous avons appris à retracer l'histoire génétique d'une famille à partir d'un arbre généalogique et dans le chapitre 14, nous avons interprété des transferts de type Southern. Nous pouvons intégrer ces méthodes aux concepts qui ont été étudiés dans ce chapitre pour rassembler des informations sur les maladies génétiques humaines. La chorée de Huntington (HD) est une maladie neurodégénérative létale, qui présente une hérédité autosomique dominante. Etant donné que les symptômes n'apparaissent généralement pas avant l'âge de 30, 40 ou 50 ans, les personnes atteintes ont souvent déjà des enfants au moment où leur maladie se déclare et certains de ces enfants risquent d'en avoir hérité. Récemment, un groupe de chercheurs a trouvé une sonde clonée (appelée G8) qui révèle un polymorphisme de l'ADN (en fait un tétramorphisme) lié à HD. La sonde et les quatre profils d'hybridation qu'elle révèle sont illustrés dans la figure qui suit. Les barres verticales représentent des sites *Hin*dIII.



a. Dessinez les profils attendus d'une hybridation à la Southern des ADN de cellules d'individus homozygotes (AA, BB, CC et DD) et des hétérozygotes (AB, AC, etc.). Sont-ils tous différents?

b. D'où proviennent les différences en termes de sites de restriction ? Pensez-vous qu'elles soient triviales ou significatives ? Expliquez.

c. L'étude de lignées de cellules hybrides homme / souris ont montré que la sonde G8 ne s'hybride qu'au chromosome humain 4. Quelle information ce résultat vous apporte-t-il ?

d. Deux familles affectées par la HD, l'une vénézuélienne, l'autre américaine, ont été soumises à une analyse de leur ADN avec la sonde G8. Les résultats de cette analyse sont montrés dans les arbres généalogique à la page suivante (les symboles noirs indiquent la présence de la maladie, les barres obliques indiquent les membres des familles qui étaient morts avant 1983). Quelles liaisons voyez-vous et quelles informations vous apportent-elles ?

e. Si un membre de la famille vénézuélienne agé de 20 ans vous consulte, quels tests envisageriez-vous de faire et que lui conseilleriez-vous ? (Envisagez tous les résultats possibles des tests.) Répétez l'exercice pour la famille américaine.

f. Comment ces données pourraient-elles être mises à profit pour identifier la déficience primaire responsable de la HD ?

g. Ces résultats seraient-ils utiles pour conseiller d'autres familles à risque ?

h. Y a-t-il des individus exceptionnels dans la généalogie illustrée ? Si oui, expliquez-les.

Solution

a.

	AA	*BB*	*CC*	*DD*	*AB*	*AC*	*AD*	*BC*	*BD*	*CD*
17,5	—	—			—	—	—	—	—	
15,0			—	—		—	—	—	—	—
8,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4,9		—		—	—		—	—	—	—
3,7	—		—		—	—	—	—		—
2,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,2	—		—		—	—	—	—		—

AD et *BC* sont identiques. Les autres sont différents.

b. Les différents profils de restriction proviennent de différences au niveau de la séquence de l'ADN. Rien ne permet de dire si ces différences sont triviales (neutres) ou potentiellement adaptatives.

c. La séquence de la sonde G8 se trouve dans le chromosome 4.

d. Construisez une table 2X2 pour le polymorphisme de chaque famille, en excluant les individus qui entrent dans la famille par mariage. Calculez χ^2. Voici le résultat pour le polymorphisme représentatif de chacune des familles.

Venezuela

	Malade	Pas malade	Total
C présent	19	1	20
C absent	0	15	15
Total	19	16	35

$\chi^2 = (19 - 10,6)^2/10,6 + (1 - 9,4)^2/9,4 + (0 - 8,4)^2/8,4 + (15-7,6)^2/7,6$
$= 6,7 + 7,5 + 8,4 + 7,2 = 29,8$, un résultat hautement significatif

Etats-Unis

	Malade	Pas malade	Total
A présent	13	7	20
A absent	0	1	1
Total	13	8	21

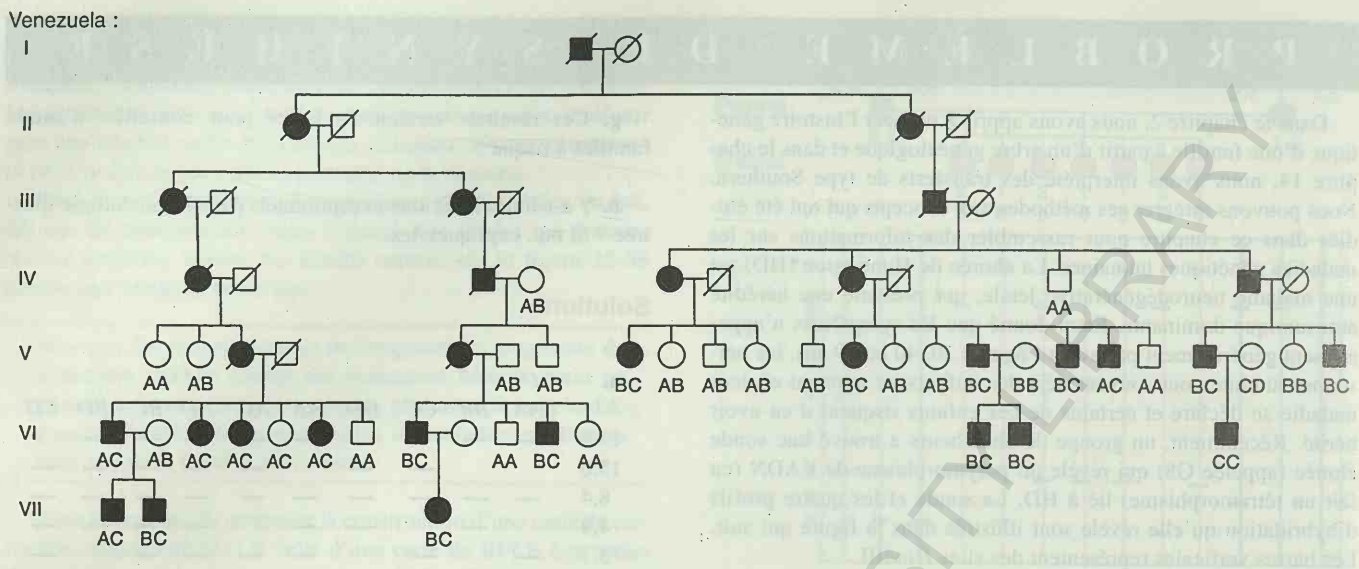
$\chi^2 = (13 - 12,4)^2/12,4 + (7 - 7,6)^2/7,6 + (0 - 12,3)^2/12,3 + (1 - 0,4)^2/0,4$
$= 0,029 + 0,047 + 12,3 + 0,9 = 13,276$, un résultat hautement significatif

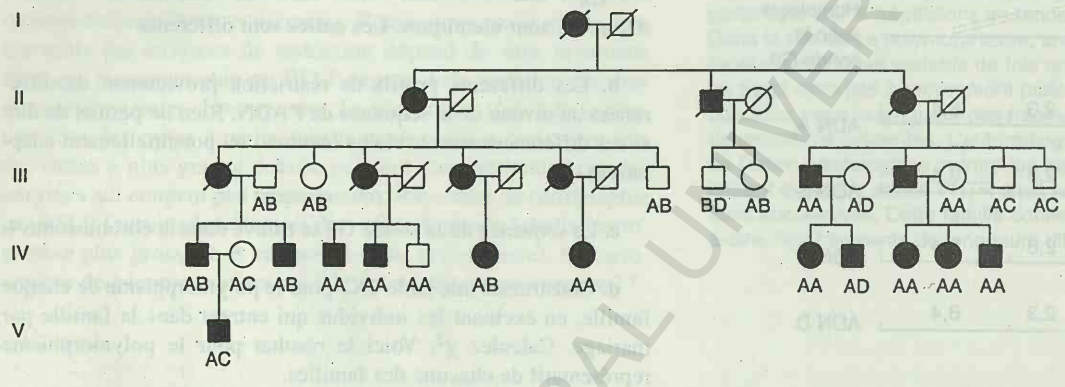
La chorée de Huntington est liée à *C* dans la famille du Venezuela et à *A* dans la famille des Etats-Unis.

e. Dans chacun des cas, vérifier la présence du polymorphisme significatif par digestion avec *Hin*dIII et hybridation avec la sonde G8.

Dans la famille vénézuélienne, un individu (VI-5) sur les 20 qui portent le polymorphisme *C* a subi un crossing-over entre le site polymorphe et le gène HD. Par conséquent, la sonde G8 s'hybride à 100% X (1/20) = 5 u.c. du gène responsable de la chorée de Huntington. Si la personne conseillée est positive pour le polymor-

BCU - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY





phisme *C*, la probabilité qu'elle porte l'allèle de la maladie est de 95%; Si le test est négatif, il y a 95% de chances qu'elle soit saine et 5% de chances qu'elle porte l'allèle responsable de la maladie.

La situation est moins claire pour la famille nord-américaine. En effet, le polymorphisme *A* est présent chez quatre des personnes qui se marient dans la famille en question et qui n'ont pas d'antécédents de la maladie de Huntington. La valeur plus basse du χ^2 pour cette famile reflète l'apport de ces individus. Leur existence rend impossible l'identification univoque d'individus ayant subi un crossing-over. Les résultats du test effectué sur la personne conseillée peuvent être interprétés en supposant que la sonde G8 identifie un polymorphisme à 5 u.c. du locus du gène de Huntington, mais ils doivent être corrigés en fonction du polymorphisme observé chez le parent malade.

Par exemple, si le parent atteint est *AA* et la personne conseillée est *A*–, la probabilité que cette dernière ait hérité l'allèle de la maladie est de 50%. Si, par contre, le parent malade est *AD* et la personne conseillée est *A*–, la probabilité qu'elle ait hérité de l'allèle de la maladie est de 95%, sauf si le parent sain porte également *A*. Dans ce dernier cas, le risque est de 50%.

f. La sonde G8 permet d'identifier la région dans laquelle se trouve l'allèle responsable de la chorée de Huntington. Le locus peut être atteint par une marche sur le chromosome. Le gène peut être transcrit et traduit et la protéine correspondante peut être identifiée.

g. Une fois que la protéine défectueuse de la maladie de Huntington est caractérisée, d'autres familles peuvent être testées directement pour la présence de la protéine.

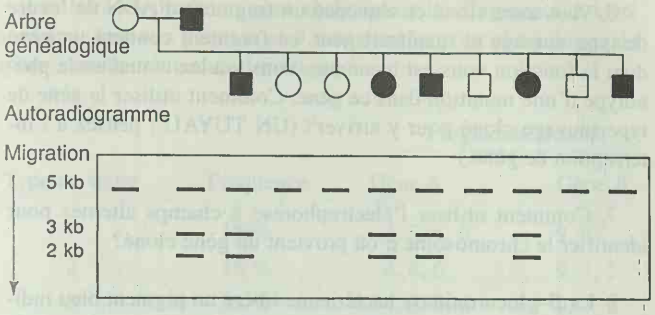
h. Une personne «exceptionnelle» a déjà été identifiée : Venezuela VI, 5, qui résulte d'un crossing-over entre le polymorphisme et le locus du gène HD. Dans l'arbre généalogique U.S., il n'ya pas d'individu dont on puisse dire qu'il résulte directement d'un crossing-over dans cette région spécifique.

(Solution élaborée par Diane K. Lavett)

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Des études sont effectuées sur les ADN de familles qui ont une histoire de présence d'une maladie autosomique dominante dont les symptômes n'apparaissent que vers l'âge de 40 ans. Un échantillon d'ADN de chaque famille est digéré par l'enzyme *Taq*I et soumis à une électrophorèse sur gel. Après un transfert de type Southern, les ADN sont hybridés avec une sonde constituée par un fragment d'ADN humain cloné dans un plasmide bactérien. La figure ci-dessous montre le profil de l'autoradiographie obtenue, aligné sur la généalogie de la famille : les membres atteints sont indiqués en noir.

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



a. Analysez en détail les relations entre les variations de l'ADN, l'ADN de la sonde et les gènes responsables de la maladie. Dessinez la région correspondante du chromosome.

b. Comment expliquez-vous le profil du dernier fils ?

c. De quelle utilité seraient ces résultats pour conseiller les membres de la famille qui comptent se marier ?

Solution

a. Tous les individus ont la bande de 5 kb, ce qui indique que la séquence correspondant à ce fragment n'a rien à voir avec la mutation. Tous les individus malades, sauf le dernier fils, ont les bandes de 2 et 3 kb. Ces deux bandes n'apparaissent pas chez les individus sains. Ceci suggère donc que l'une de ces deux bandes, ou les deux, sont dans le gène muté ou proches de celui-ci.

b. Les caractéristiques du dernier fils malade indiquent que les bandes de 2 et 3 kb ne proviennent pas du gène en question. Dans les chromosomes de ce fils, un crossing-over s'est produit entre les deux bandes et le gène muté.

c. Les bandes de 2 et 3 kb sont étroitement liées à l'allèle dominant. Leur présence chez un individu indique un risque élevé de développer la maladie, alors que leur absence indique un risque faible. Le risque exact ne peut être calculé tant que l'on ne connaît pas la distance exacte entre les deux bandes et le gène muté. Bien qu'une estimation grossière des distances puisse être obtenue à partir de la généalogie présentée, l'échantillon est trop petit pour faire un calcul fiable.

(Solution rédigée par Diane K. Lavett)

2. Un plasmide de levure qui porte le gène de levure *leu2*$^+$ est utilisé pour transformer des cellules de levure haploïdes *leu*$^-$ qui ne réversent pas. Plusieurs colonies transformées *leu2*$^+$ apparaissent sur un milieu sans leucine. Donc le gène *leu2*$^+$ est entré dans les cellules. Vous vous demandez maintenant ce qui s'est passé à l'intérieur de ces cellules. Des croisements avec des testeurs *leu2*$^-$ révèlent qu'il y a en fait trois types de transformants A, B et C qui reflètent un devenir différent de l'ADN *leu2*$^+$ dans différentes cellules transformées. Les résultats sont les suivants :

Type A X *leu2*$^-$ $\longrightarrow$ $\frac{1}{2}$ *leu*$^-$
$\frac{1}{2}$ *leu*$^+$, × *leu2*$^+$ standard
$\longrightarrow$ $\frac{3}{4}$ *leu*$^+$
$\frac{1}{4}$ *leu*$^-$

Type B X *leu2*$^-$ $\longrightarrow$ $\frac{1}{2}$ *leu*$^-$
$\frac{1}{2}$ *leu*$^+$, × *leu2*$^+$ standard
$\longrightarrow$ 100 % *leu*$^+$
0 % *leu*$^-$

Type C X *leu2*$^-$ $\longrightarrow$ 100 % *leu*$^+$

Quels sont les destins de l'ADN *leu*$^+$ suggérés par ces résultats ? Envisagez *toutes* les possibilités. Faites un dessin si possible.

Solution

Si le plasmide de levure ne s'intègre pas, il est répliqué indépendamment des chromosomes. A la méiose, les copies du plasmide seront réparties entre les cellules filles, ce qui produira 100% de transformants. C'est ce qui est observé pour les transformants de type C.

Si un exemplaire du plasmide est intégré, la descendance d'un croisement avec une souche *leu2*$^-$ se présentera dans un rapport 1 *leu*$^+$: 1 *leu*$^-$. C'est ce qui est observé pour les types A et B.

Quand les descendants *leu*$^+$ sont croisés avec une souche *leu2*$^+$ standard, les résultats obtenus dans le cas du type A suggèrent que le gène inséré ségrège indépendamment du gène *leu2*$^+$ normal. Par contre, les résultats obtenus dans le cas du type B suggèrent que le gène inséré se trouve au même locus que l'allèle *leu2*$^+$ normal. Par conséquent, le gène ne s'est pas inséré au locus *leu2* dans les transformants de type A, mais bien dans les transformants de type B.

(Solution rédigée par Diane K. Lavett)

PROBLÈMES

1. Des plantes de tabac transgéniques ont été obtenues dans lesquelles un gène intéressant a été introduit par l'intermédiaire d'un vecteur plasmidique Ti, en même temps qu'un gène adjacent conférant la résistance à la kanamycine. Le profil de transmission de l'insertion chromosomique a été suivi en testant la descendance pour la résistance à la kanamycine. Deux types de plantes peuvent être distingués. Quand la plante 1 est croisée avec une plante de tabac sauvage (testeur), 50 pour cent de la descendance est résistante à la kanamycine et 50 pour cent est sensible. Quand la plante 2 est croisée avec une plante sauvage, 75 pour cent de la descendance est résistante à la kanamycine et 25 pour cent est sensible. Quelle est la différence entre les deux plantes transgéniques?

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Que prédiriez-vous en ce qui concerne le gène d'intérêt?

2. *Neurospora* a sept chromosomes. Les remaniements chromosomiques suivants sont observés dans des souches différentes :

a. Une inversion paracentrique affectant le chromosome 1 (le plus grand des sept).

b. Une inversion péricentrique affectant le chromosome 1.

c. Une tranlocation réciproque dans laquelle à peu près la moitié du chromosome 1 a été échangée avec la moitié environ du chromosome 7 (le plus petit des sept).

d. Une translocation insertionnelle non réciproque (une partie d'un chromosome s'est insérée dans un autre).

e. Une disomie (n + 1).

f. Une monosomie (2n – 1).

g. Une duplication en tandem d'une grande partie du chromosome 1.

L'ADN de ces différentes souches ainsi que d'une souche sauvage a été isolé très précautionneusement pour éviter les cassures d'origine mécanique et des échantillons ont été soumis à une électrophorèse en champs alternés. A quel profil de bandes vous attendriez-vous pour chacune des souches?

3. Vous avez cloné un gène de plante codant pour une protéine de la photosynthèse dans un vecteur bactérien. Vous désirez savoir si ce gène s'exprime dans la racine ou dans d'autres tissus non photosynthétiques. Comment allez-vous vous y prendre? Donnez autant de détails expérimentaux que possible.

4. Deux sondes du chromosome 5 de *Neurospora* détectent des loci RFLP *Pst* I distants d'environ 20 u.c. Sur un transfert de type Southern provenant de la souche 1, la sonde A «allume» deux fragments de 1 et 2 kb respectivement et la sonde B allume deux fragments de 4 et 1,5 kb. Sur un transfert provenant de la souche 2, la sonde A détecte une bande de 3 kb et la sonde B, une bande de 5,5 kb. Dessinez les profils de bandes *Pst* I obtenus sur des transferts Southern provenant de cultures d'ascospores individuelles issues du croisement des souches 1 et 2, en utilisant les deux sondes à la fois. N'oubliez pas de dire à combien de types d'asques vous vous attendez et de tenir compte des crossing-over qui peuvent se produire.

5. La substitution d'une seule paire de nucléotides est responsable de la mucoviscidose chez une famille déterminée. Cette mutation fait disparaître un site *Eco* RI. Comment utiliser cette information pour conseiller les individus de cette famille en leur expliquant la probabilité qu'ils soient porteurs? Expliquez les expériences nécessaires. Supposez que vous identifiiez une femme porteuse dans cette famille et qu'elle soit mariée à un homme hétérozygote pour *une autre* mutation responsable de la mucoviscidose. Que diriez-vous à ce couple du risque que leurs enfants soient atteints?

6. Vous avez cloné et séquencé un fragment d'ADN de levure de type sauvage et manifestement, ce fragment contient un gène dont la fonction vous est inconnue. Vous voulez connaître le phénotype d'une mutation dans ce gène. Comment utiliser le gène de type sauvage cloné pour y arriver? (UN TUYAU : pensez à l'interruption de gène.)

7. Comment utiliser l'électrophorèse à champs alternés pour identifier le chromosome d'où provient un gène cloné?

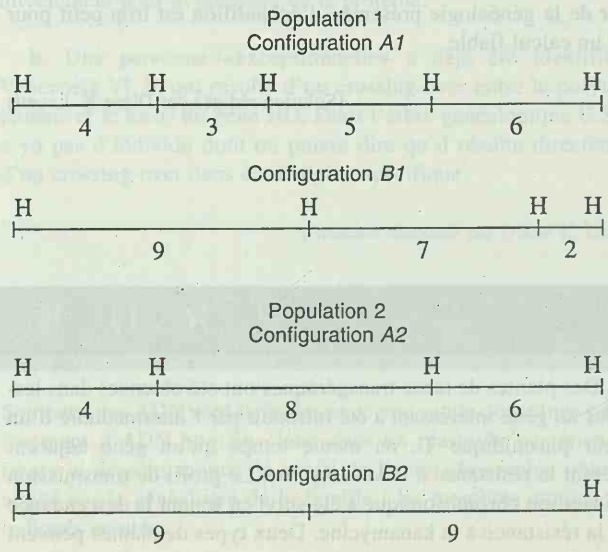
8. La β–glucuronidase bactérienne libère un pigment bleu indigo à partir d'une substance incolore appelée *X–gluc*. Le gène de la glucuronidase fonctionne aussi dans les plantes pour autant qu'on le dote d'une région promoteur de plante. Comment utiliser ce gène comme indicateur pour savoir dans quels tissus de la plante un gène nouvellement cloné est normalement exprimé? (On suppose que le *X–gluc* est capté par les tissus végétaux.)

9. Chez la souris, une sonde permet d'identifier un polymorphisme de fragments de restriction *Hin*dIII simple caractérisé par deux allèles de 1,7 kb et 3,8 kb respectivement. Une souris hétérozygote pour l'allèle dominant «queue tordue» et aussi pour le RFLP en question est croisée avec une souris de type sauvage qui ne présente que le fragment de 3,8 kb. Quarante pour cent des descendants à queue tordue sont homozygotes pour l'allèle de 3,8 kb et soixante pour cent sont des hétérozygotes qui présentent les deux formes de 1,7 et 3,8 kb.

a. Le locus «queue tordue» est-il lié au locus RFLP? Dessinez les chromosomes des parents et des descendants pour illustrer votre réponse.

b. Quels RFLP prédisez-vous chez les descendants de type sauvage et dans quelles proportions?

10. Les gènes *A* et *B* qui sont localisés sur le chromosome 4 de la levure sont utilisés comme marqueurs génétiques lors d'une étude de deux populations de levures haploïdes. Les deux populations expriment différentes formes alléliques de ces deux gènes : dans la population 1, le gène *A* donne *A1* et le gène *B* donne *B1* ; dans la population 2, le gène *A* donne *A2* et le gène *B* donne *B2*. Les gènes porteurs de ces allèles se distinguent par la carte de restriction par l'enzyme *Hin*dIII :



Les tétrades produites sont analysées et les fragments d'ADN correspondant aux gènes *A* et *B* sont donnés, pour chaque type de spore, dans le tableau ci-dessous :

		Fragments *Hin*dIII	
Type de spore	Fréquence	Gène *A*	Gène *B*
1	15 %	4, 3, 5, 6	9, 9
2	15 %	4, 8, 6	9, 7, 2
3	35 %	4, 3, 5, 6	9, 7, 2
4	35 %	4, 8, 6	9, 9

a. Quelles sont les formes alléliques des tétrades produites ?

b. Comment sont-elles formées ?

c. Dessinez la carte des liaisons.

(Problème 10 conçu par Joan McPherson.)

11. La plante *Arabidopsis thaliana* est transformée par un plasmide dérivé de Ti qui contient une insertion du gène de la résistance à la kanamycine dans l'ADN-T. Deux colonies résistantes à la kanamycine (A et B) sont obtenues après sélection et des plantes sont régénérées à partir de celles-ci. Les plantes s'autoféconden avec les résultats suivants :

Plante A autofécondée ⟶ $\frac{3}{4}$ de la descendance résistante à la kanamycine
$\frac{1}{4}$ de la descendance sensible à la kanamycine

Plante B autofécondée ⟶ $\frac{15}{16}$ de la descendance résistante à la kanamycine
$\frac{1}{16}$ de la descendance sensible à la kanamycine

a. Dessinez les chromosomes impliqués chez chacune des deux plantes.

b. Expliquez la différence entre les deux rapports.

12. Deux plasmides circulaires de levure différents (YP1 et YP2) sont utilisés pour transformer des cellules leu⁻ vers leu⁺. Les cultures leu⁺ obtenues dans les deux expériences de transformation sont croisées indépendamment avec une souche leu⁻ de signe conjugant opposé. Les résultats sont les suivants :

YP1 leu⁺ X leu⁻ ⟶ toute la descendance est leu⁺ et l'ADN de toutes les colonies testées s'hybride avec une sonde spécifique du plasmide YP1

YP2 leu⁺ X leu⁻ ⟶ $\frac{1}{2}$ de la descendance est leu⁺ et s'hybride avec une sonde spécifique du plasmide YP2

$\frac{1}{2}$ de la descendance est leu⁻ et ne s'hybride pas avec la sonde YP2

a. Expliquez le destin différent des deux plasmides lors de la transformation.

b. Si l'ADN total des transformants obtenus avec YP1 et YP2 est digéré par une enzyme de restriction qui coupe une fois le vecteur (et pas l'insert), pouvez-vous prédire les résultats de l'électrophorèse de l'ADN suivie d'hybridation de type Southern en utilisant dans chaque cas le plasmide transformant comme sonde.

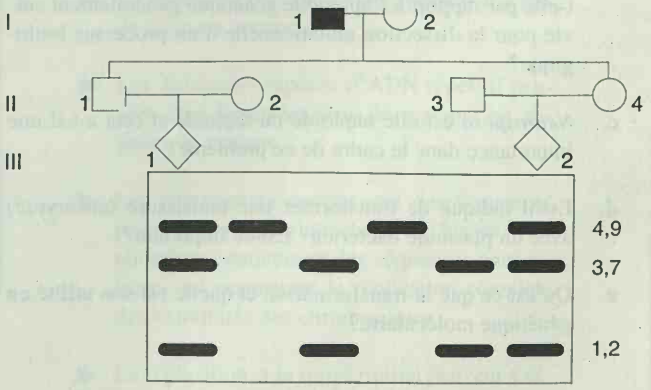
13. Un plasmide linéaire mar1 de *Neurospora crassa* semble se comporter comme un «passager inoffensif» qui ne handicape pas son hôte. Sa carte de restriction est la suivante :

Toutefois, on suppose que ce plasmide s'insère parfois dans l'ADN génomique. Pour tester cette hypothèse, le grand fragment central *Bgl*II du plasmide est cloné dans un vecteur de type pUC et le clone est utilisé comme sonde pour une hybridation de type Southern avec l'ADN génomique d'une souche contenant le plasmide mar1, coupé par *Xba*I. Quel sera le profil de l'autoradiographie si

a. le plasmide ne s'insère pas dans le génome?

b. le plasmide s'insère parfois dans le génome?

14. Le propositus de l'arbre généalogique ci-dessous est un homme atteint de la chorée de Huntington (HD), une maladie à transmission dominante. Ses deux enfants à risque ont fait effectuer un diagnostic prénatal bien qu'ils ne voulussent pas que leur propre cas soit évalué. Le transfert de Southern a été analysé avec une sonde qui révèle un système de deux allèles (un polymorphisme de longueur de fragments de restriction dont les tailles sont de 4,9 kb ou de 3,7 et 1,2 kb) qui se trouve à 4% de recombinaison de HD. Pour chacun des deux échantillons fétaux analysés, calculez la probabilité que le foetus hérite de l'allèle HD



(Problème fourni par Steve Wood.) (NdT : les deux profils foetaux occupent les pistes extérieures de l'autoradiogramme.)

15. Un généticien de *Neurospora* s'intéresse aux gènes qui contrôlent la croissance des hyphes. Il décide de cloner certains de ces gènes. On sait grâce à une analyse mutationnelle précédente de *Neurospora* qu'un type courant de mutants forme des petites colonies sur boîte à cause d'un développement hyphal anormal. C'est pourquoi il décide de procéder à un étiquetage de gènes en utilisant la mutagénèse insertionnelle pour produire des mutants formant des

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

colonies de type anormal. Il transforme les cellules de *Neurospora* avec un plasmide bactérien porteur du gène de résistance au benomyl (*ben-R*) et isole des colonies résistantes sur un mileu contenant du benomyl. Certaines colonies présentent le phénotype «petites colonies» recherché. Elles se révèlent être de deux types :

Type 1 *col ben-R* X type sauvage (+ *ben-S*)

Descendance $\frac{1}{2}$ *col ben-R*

$\frac{1}{2}$ + *ben-S*

Type 2 *col ben-R* X type sauvage (+ *ben-S*)

Descendance $\frac{1}{4}$ *col ben-R*

$\frac{1}{4}$ *col ben-S*

$\frac{1}{4}$ + *ben-R*

$\frac{1}{4}$ + *ben-S*

a. Expliquez la différence entre ces deux groupes de résultats.

b. A partir de quel groupe doit-il essayer de cloner les gènes affectant la croissance des hyphes?

c. Quelle est la suite des opérations pour son expérience d'étiquetage?

d. Si une sonde spécifique du plasmide bactérien était disponible, quelle descendance devrait-elle être sondée?

Décomposons le problème

a. Qu'est-ce que la croissance des hyphes et pourquoi s'y intéresser?

b. Comment l'approche suivie dans cette expérience se situe-t-elle par rapport à l'approche génétique généralement suivie pour la dissection mutationnelle d'un processus biologique?

c. *Neurospora* est-elle haploïde ou diploïde et ceci a-t-il une importance dans le cadre de ce problème?

d. Est-il indiqué de transformer une moisissure (eucaryote) avec un plasmide bactérien? Est-ce important?

e. Qu'est-ce que la transformation et quelle est son utilité en génétique moléculaire?

f. Comment prépare-t-on les cellules pour la transformation?

g. Quel est le sort de l'ADN transformé si la transformation est réussie?

h. Faites un schéma du captage d'un plasmide dans la cellule-hôte et d'une transformation réussie et stable.

i. Est-il important pour ce protocole expérimental de savoir ce qu'est le benomyl? Quel rôle le gène de résistance au benomyl joue-t-il dans l'expérience? L'expérience peut-elle marcher avec un autre marqueur de résistance?

j. Que signifie le terme «formation de colonies» dans le contexte présent? Pourquoi l'expérimentateur pense-t-il que l'obtention et la caractérisation de mutations «formation de colonies» va aider à la compréhension du phénomène de croissance hyphale?

k. A quelle type d'»analyse mutationnelle précédente» fait-on allusion?

l. Dessinez l'aspect d'une boîte de Petri caractéristique après transformation et sélection, en accordant un soin particulier à la représentation des colonies.

m. Qu'est-ce que l'étiquetage? Quel rapport a-t-il avec la mutagénèse insertionnelle? Comment une insertion provoque-t-elle une mutation?

n. Comment effectue-t-on des croisements et isole-t-on la descendance chez *Neurospora*?

o. La recombinaison joue-t-elle un rôle quelconque dans ce problème? Peut-on calculer une fréquence de recombinaison?

p. Pourquoi y a-t-il deux groupes de mutations «formation de colonies»? Peut-on prédire lequel est le plus commun?

q. Qu'est-ce qu'une sonde? Quelle est l'utilité des sondes en génétique moléculaire? Comment effectuer un criblage?

r. Comment obtenir une sonde spécifique du plasmide bactérien?

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

16

Structure et fonction des chromosomes eucaryotiques

Chromosomes en écouvillon. Les chromosomes de certains animaux femelles présentent cet aspect d'écouvillons un peu hirsutes pendant le stade diplotène de la méiose. Cette structure permet de bien observer ce qu'on pense être l'organisation de tous les chromosomes : une armature centrale (qui apparaît ici comme un fil brillant) à laquelle se rattachent des boucles latérales (colorées en rouge) constituées d'une molécule d'ADN continue, repliée et associée à des histones. (M. Roth et J. Gall.)

CONCEPTS-CLÉS

- Un chromosome ne contient qu'une seule longue molécule d'ADN
- L'ADN s'enroule autour de bobines de protéines. Ces unités de base forment des boucles puis des surenroulements successifs, jusqu'à produire la structure caractéristique du chromosome eucaryotique.
- Le degré de condensation de l'ADN influence l'activité des gènes
- Une part importante de l'ADN eucaryotique, qu'il soit codant ou non, est présente en plusieurs exemplaires (ADN répétitif).
- La majeure partie de l'ADN répétitif n'a pas de fonction connue
- Les différentes espèces d'ADN répétitif peuvent être dispersées dans le génome ou alignées en tandem
- Les centromères contiennent des séquences particulières qui s'attachent au fuseau. Les télomères contiennent des séquences particulières qui permettent la réplication complète des extrémités des chromosomes.
- La réplication et la transcription peuvent s'effectuer sans déplacement des bobines de protéines.

UNIVERSITY LIBRARY

Jusqu'ici, nous avons considéré les chromosomes eucaryotiques comme des lignes droites tracées sur une feuille de papier. Cette représentation suffit pour l'analyse génétique classique et reflète assez bien le niveau de compréhension de la structure des chromosomes qui prévalait jusque dans les années 1960. Les avancées technologiques récentes ont transformé ces simples lignes droites en entités moléculaires structurées. Dans ce chapitre, nous discuterons d'abord de certains aspects de l'architecture du génome eucaryotique en examinant sa topologie au niveau moléculaire. Plusieurs éléments structuraux des chromosomes que nous avons observés au microscope, tels que les bandes, les centromères et les organisateurs nucléolaires, doivent être réexaminés à la lumière d'analyses effectuées à plus haute résolution. Une fois que nous disposerons d'une image plus précise de ces éléments, nous aborderons les problèmes que posent la réplication et la transcription d'un ADN emmagasiné dans des structures très compactes. La méthodologie utilisée pour ce genre d'études est une combinaison puissante de génétique, de biologie moléculaire et de microscopie optique et électronique.

La taille des génomes eucaryotiques

Les génomes d'eucaryotes contiennent beaucoup plus d'ADN que ceux des procaryotes. Le tableau 16-1 montre la taille du génome haploïde de quelques eucaryotes qui sont devenus des organismes modèles pour l'analyse génomique. La taille du génome d'*E. coli* est donnée à titre de comparaison. Il est frappant de réaliser que le plus petit des sept chromosomes de la moisissure *Neurospora* contient autant d'ADN que le génome entier d'*E. coli*.

Le tableau 16-1 montre aussi la grande diversité de taille des génomes d'eucaryotes. Bien qu'un certain rapport existe entre la complexité d'un organisme et la taille de son génome, il existe des exceptions remarquables. Par exemple, le génome haploïde de certains amphibiens contient jusqu'à 10^{11} paires de nucléotides, près de 100 fois plus que celui de la plupart des mammifères ! Nous verrons que cette disproportion, appelée *paradoxe de la valeur de C* (*C* représente la concentration d'ADN), résulte principalement de la grande variation entre espèces de la quantité d'ADN répétitif sans fonction apparente.

Quelle est la relation entre la taille des génomes exprimée en paires de nucléotides et les unités génétiques que nous avons utilisées jusqu'à présent, les unités cartographiques ou les centimorgans ? Chez *Neurospora crassa*, la taille du génome est de 2700 kilobases (kb) et la carte génétique obtenue en totalisant les intervalles génétiques mesurés sur tous les chromosomes est de 1000 unités cartographiques. Une unité cartographique correspond donc approximativement à 2.7 kb. Un calcul similaire effectué dans le cas de l'Homme montre que chez notre espèce, 1 unité cartographique correspond à environ 1 mégabase, soit 1000 kb.

Voyons ce que signifient ces tailles de génomes en unités plus familières telles que les millimètres ou les mètres. Une cellule d'*E. coli* contient environ 1,3 mm d'ADN (environ 4200 kb). Le contraste est frappant quand on compare à cette cellule de procaryote une cellule humaine qui contient environ 2 m d'ADN (6000000 de kb) ou 1 m par jeu de chromosomes. Le corps humain est constitué de quelque 10^{13} cellules et contient dès lors 2×10^{13} m d'ADN. Une idée de ce que représente la longueur de cet ADN est donnée par sa comparaison avec la distance de la terre au soleil, qui est de $1{,}5 \times 10^{11}$ m. L'ADN contenu dans votre corps pourrait relier 50 fois notre planète au soleil. Ceci montre à quel point l'ADN des eucaryotes est condensé. En fait, les 2 m d'ADN d'une cellule humaine sont emmagasinés dans 46 chromosomes contenus dans un noyau de 0,006 mm de diamètre ! Dans ce chapitre, il nous faudra transposer ce que nous avons appris de la structure et de la fonction des gènes eucaryotiques dans le «monde réel» du noyau. Au lieu de nous représenter les machineries de réplication et de transcription se déplaçant le long de lignes droites et dégagées qui figuraient les gènes dans les chapitres précédents, nous devons nous représenter le déroulement de ces processus à l'intérieur de quelque chose qui ressemble fort à une pelote de laine très serrée.

Tableau 16-1. Taille du génome haploïde d'organismes choisis comme systèmes génétiques modèles (en paires de nucléotides)

Organisme	Groupe	Taille du génome
T4	bactériophage	2.0×10^5
E. coli	bactérie	4.2×10^6
Saccharomyces cerevisiae	levure	1.8×10^7
Neurospora crassa	moisissure	2.7×10^7
Dictyostelium discoideum	mixomycète	5.4×10^7
Caenorhabditis elegans	nématode	1.0×10^8
Arabidopsis thaliana	plante	1.0×10^8
Drosophila melanogaster	insecte	1.4×10^8
Mus musculus	mammifère	3.0×10^9
Homo sapiens	mammifère	3.3×10^9
Zea mays	plante	5.4×10^9

Un chromosome contient une seule molécule d'ADN

Quand des cellules eucaryotiques sont brisées et que le contenu de leur noyau est examiné au microscope électronique, les chromosomes apparaissent sous la forme d'échevaux emmêlés de fibres ressemblant à des spaghetti (figure 16-1). Ces fibres ont un diamètre d'environ 30 nm. Les observations méticuleuses d'Ernest DuPraw, dans les années 1960, ont montré qu'aucune extrémité libre n'émerge de ces amas fibreux. Ceci suggère que chaque chromosome soit constitué d'une seule fibre longue et mince enroulée en pelote. Si cette fibre correspond à une molécule d'ADN, nous arrivons à l'idée que chaque chromosome contient une seule molécule d'ADN repliée de nombreuses fois sur elle-même.

En 1973, Ruth Kavenoff et Bruno Zimm ont montré expérimentalement que cette idée était probablement correcte. Ils ont étudié l'ADN de *Drosophila* grâce à une technique dite de relaxation viscoélastique qui consiste à mesurer les propriétés d'élasticité des molécules d'ADN en solution. De façon très simplifiée, la méthode consiste à étirer l'ADN au maximum – un peu comme s'il s'agissait d'un ressort – par la rotation d'une pale dans la solution, puis à le laisser se relâcher complètement. Le temps nécessaire à la relaxation complète de l'ADN est proportionnel à la taille des molécules les

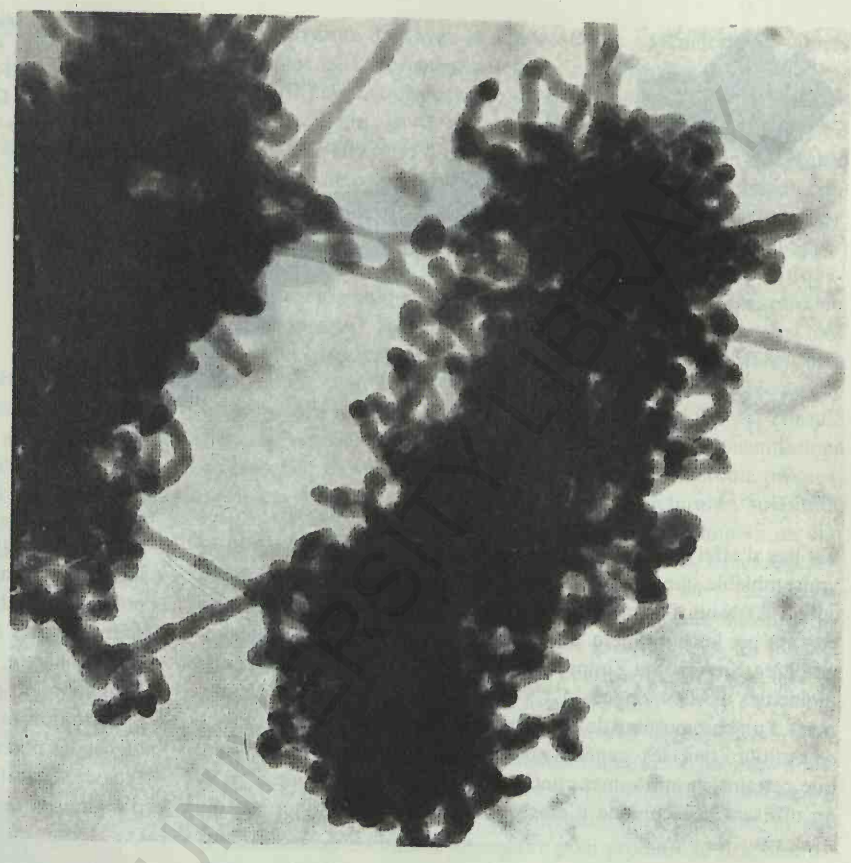


Figure 16-1. Des chromosomes provenant d'une cellule d'embryon d'abeille à la métaphase, vue au microscope électronique. Chaque chromosome se présente comme un écheveau formé par une fibre continue de 30 nm de diamètre. (Tiré de E.J. DuPraw, *Cell and Molecular Biology*, p.531, Fig. 18-4. Copyright © 1968 Academic Press, Inc.)

plus longues présentes dans la solution. *Drosophila melanogaster* possède quatre paires de chromosomes. Kavenoff et Zimm ont obtenu une valeur correspondant à 41 X 10^9 daltons pour la plus grande molécule d'ADN présente dans le génome de type sauvage. Ensuite, ils ont analysé l'ADN de deux mutants porteurs de remaniements chromosomiques (figure 16-2). Dans l'un deux, une translocation d'un X vers un chromosome 3 produit un chromosome qui est plus long d'un tiers que le plus long des chromosomes du type sauvage. La valeur mesurée par viscoélasticité correspondait cette fois à 58 X 10^9 daltons, donc elle était aussi augmentée d'un tiers. L'autre remaniement est une inversion péricentrique qui modifie le rapport des longueurs des bras du chromosome 3 sans toutefois en modifier la longueur totale. La valeur obtenue par viscoélasticité correspondait à 42 X 10^9 daltons, ce qui n'est pas significativement différent de celui du chromosome 3 du type sauvage. Ainsi, un remaniement qui accroît la taille d'un chromosome augmente le poids moléculaire de l'ADN de ce chromosome dans exactement les mêmes proportions alors qu'un remaniement qui n'altère pas la taille du chromosome

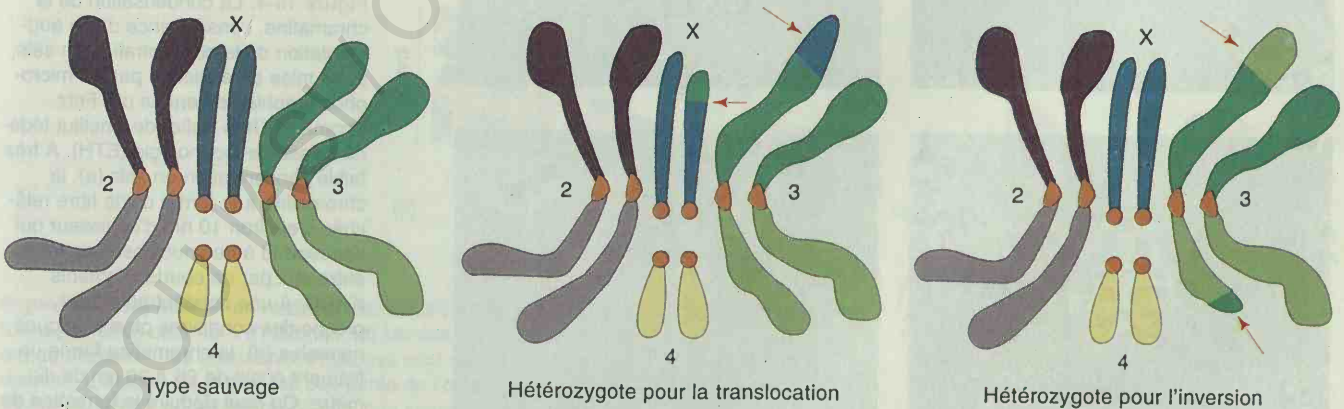


Figure 16-2. Les génomes de *Drosophila* utilisés pour mesurer la longueur des molécules d'ADN dans les chromosomes. Les chromosomes de trois femelles sont représentés : l'une est de type sauvage, les autres sont respectivement hétérozygote pour une translocation X–3 et hétérozygote pour une inversion péricentrique du chromosome 3. Les flèches indiquent les points de rupture. Seule la translocation produit une molécule d'ADN significativement plus longue.

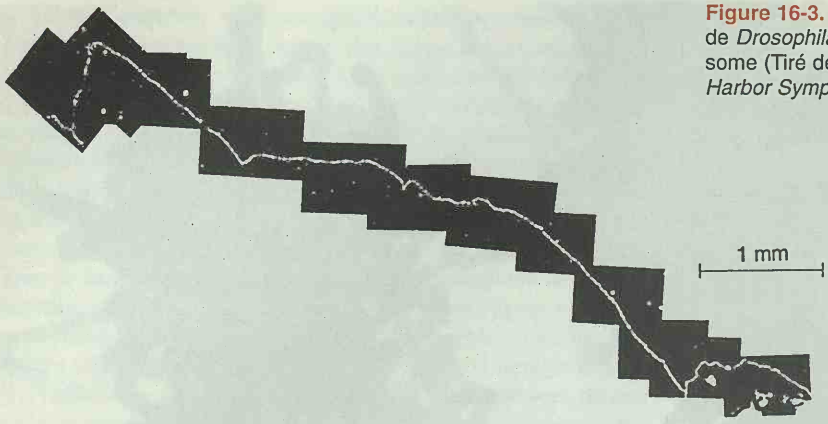


Figure 16-3. Microphotographie recomposée d'une molécule d'ADN de *Drosophila*. Elle mesure 1,5 cm est correspondrait à un chromosome (Tiré de R. Kavenoff, L.C. Klotz et B.H. Zimm. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 38, 1974, 4.)

n'a pas d'effet sur la taille de l'ADN correspondant. Il était donc vraisemblable que chaque chromosome contienne une seule molécule d'ADN qui s'étend d'une extrémité du chromosome à l'autre en passant par le centromère. En mettant bout à bout des microphotographies, Kavenoff et Zimm ont aussi pu reconstituer des images de molécules d'ADN longues d'1,5 cm qui correspondaient probablement à un chromosome de *Drosophila* (figure 16-3).

Aujourd'hui, les généticiens peuvent démontrer directement que certains chromosomes contiennent une seule molécule d'ADN en utilisant la technique d'électrophorèse à champs alternés, qui permet de séparer de très longues molécules d'ADN en fonction de leur taille (Chapitres 15 et 17). Lorque l'ADN d'un organisme qui possède des chromosomes assez courts, comme *Neurospora*, est soumis à une électrophorèse de ce type pendant un temps suffisamment long, le nombre de bandes séparées dans le gel est égal au nombre de chromosomes (sept, dans le cas de *Neurospora*). Si un chromosome contenait plus d'une molécule d'ADN, le nombre de bandes observé serait supérieur au nombre de chromosomes. Ce type de séparation ne peut s'appliquer aux très longs chromosomes d'organismes tels que *Drosophila* ou que l'Homme, dont l'ADN ne

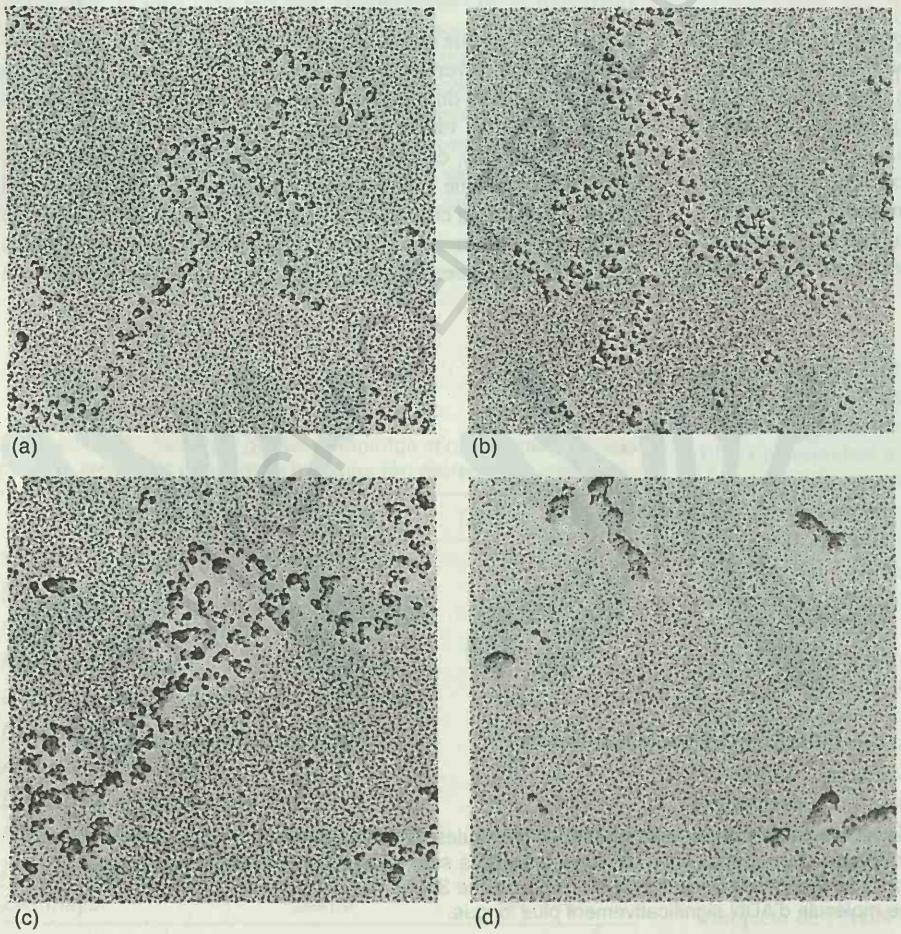


Figure 16-4. La condensation de la chromatine, conséquence d'une augmentation de la concentration en sels, a été mise en évidence par les microphotographies obtenues par Fritz Thoma et Theo Koller de l'Institut fédéral suisse de technologie (ETH). A très faible concentration en sels (a), la chromatine a la forme d'une fibre relâchée d'environ 10 nm d'épaisseur qui correspond à des nucléosomes reliés entre eux par de courts segments d'ADN. A une concentration plus proche des conditions physiologiques normales (d), la chromatine forme un filament épais de 25 à 30 nm de diamètre. On peut déduire la formation de ce solénoïde de l'examen de la chromatine à des forces ioniques intermédiaires et croissantes (b, c) : il provient d'un repliement du filament de nucléosomes. Le grossissement est ici d'environ 80 000 ×.

migre pas dans le gel à cause de sa très grande taille, mais tous les résultats concourent à prouver le principe général qu'un chromosome contient une molécule d'ADN.

Message Chaque chromosome eucaryotique contient une longue molécule d'ADN repliée sur elle-même.

Le rôle des histones dans l'emmagasinage de l'ADN

Puisqu'une molécule d'ADN chromosomique étirée est beaucoup plus longue qu'un chromosome, elle doit nécessairement être condensée par un emmagasinage efficace. Quels sont les mécanismes responsables ? Comment le très long filament d'ADN est-il converti en ce bâtonnet compact et dense qu'est un chromosome ? Le matériau qui compose les chromosomes est appelé **chromatine**. Il est constitué d'ADN et de protéines. Quand la chromatine est extraite du noyau et exposée à des concentrations salines différentes, elle présente des degrés de compaction, ou de condensation, différents qui peuvent être distingués au microscope électronique (figure 16-4). Aux concentrations salines faibles, on observe une structure d'environ 10 nm de diamètre qui ressemble à un collier de perles assez espacées. Le fil entre les grains du collier peut être digéré par la DNase (l'enzyme désoxyribonucléase), ce qui indique qu'il s'agit d'ADN. Les grains du collier sont appelés des **nucléosomes**. Ils sont composés de protéines spécifiquement chromosomiques appelées **histones** et d'ADN. La structure des histones est conservée de façon remarquable à travers tout l'éventail des organismes eucaryotiques et les nucléosomes contiennent toujours un octamère constitué de deux molécules de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. L'ADN est enroulé deux fois autour de l'octamère (figure 16-5a). Aux concentrations salines plus élevées, le collier de nucléosomes s'enroule progressivement sur lui-même pour former une structure en **solénoïde** (figure 16-5b). Quand il se forme in vitro, ce solénoïde a un diamètre de 30 nm et il correspond probablement aux structures ressemblant à des spaghetti présentées sur la figure 16-1. La structure en solénoïde semble être stabilisée par les interactions entre des molécules d'une autre histone, H1, qui «verrouillent» les nucléosomes et qui occupent une position centrale dans la structure en solénoïde, ainsi que le montre la figure 16-5b.

Nous voyons donc qu'un premier niveau de condensation de l'ADN est réalisé par son enroulement autour de bobines d'histones et qu'un degré d'enroulement supplémentaire est obtenu par la formation de la structure en solénoïde. Un troisième niveau d'enroulement est encore nécessaire pour produire la structure tridimensionnelle que nous appelons un chromosome.

Niveaux supérieurs d'enroulement

De nombreuses études cytogénétiques montrent que les chromosomes vus au microscope sont enroulés, et la figure 16-6 en montre un bel exemple provenant d'un noyau de protozoaire. Alors que le diamètre de la structure en solénoïde est de 30 nm, le

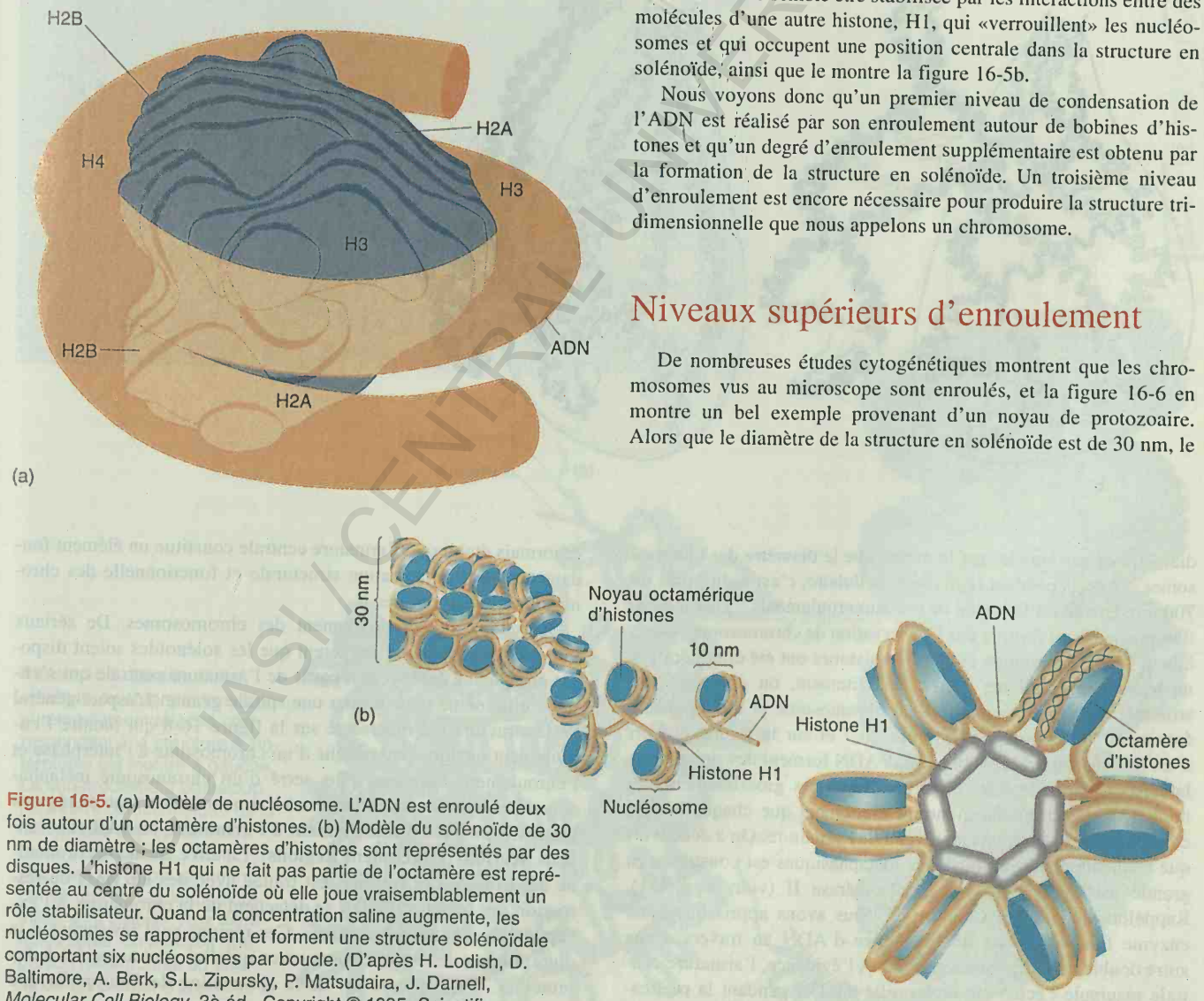


Figure 16-5. (a) Modèle de nucléosome. L'ADN est enroulé deux fois autour d'un octamère d'histones. (b) Modèle du solénoïde de 30 nm de diamètre ; les octamères d'histones sont représentés par des disques. L'histone H1 qui ne fait pas partie de l'octamère est représentée au centre du solénoïde où elle joue vraisemblablement un rôle stabilisateur. Quand la concentration saline augmente, les nucléosomes se rapprochent et forment une structure solénoïdale comportant six nucléosomes par boucle. (D'après H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3è éd., Copyright © 1995, Scientific American Books)

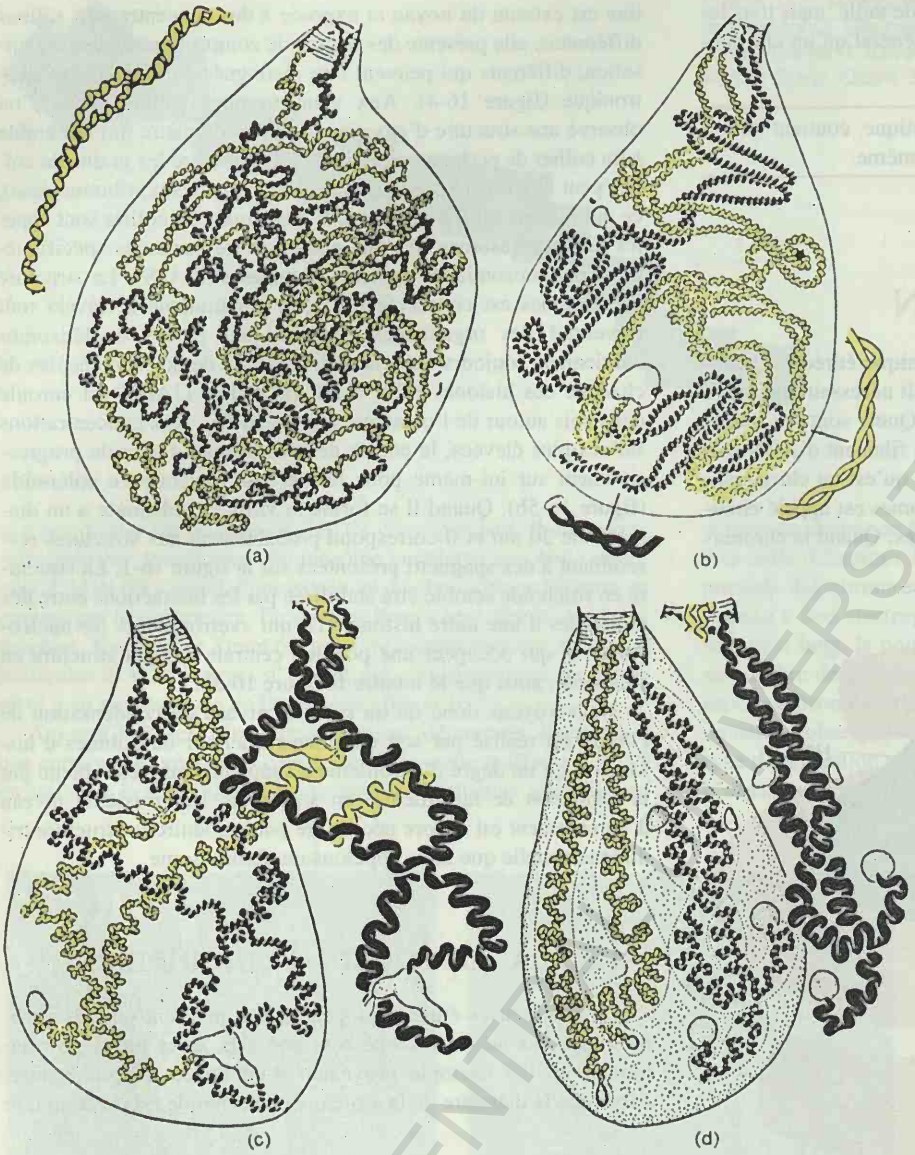


Figure 16-6. Ces dessins de chromosomes à la prophase méiotique chez un protozoaire montrent les différents degrés d'enroulement et de surenroulement que l'on peut distinguer au microscope optique. Deux grands chromosomes sont montrés : l'un jaune, l'autre noir ; les croquis (a) à (d) suivent une progression. (a) On distingue l'enroulement bien que la réplication soit initiée. (b) La réplication est bien avancée. (c) Début du surenroulement. (d) Le surenroulement est bien établi. (Tiré de L.R. Cleveland, «The Whole Life Cycle of Chromosomes and Their Coiling Systems», *Transactions of the American Philosophical Society,* 39, 1949, 1.)

diamètre de ces boucles est le même que le diamètre des chromosomes observés pendant la division cellulaire, c'est-à-dire près de 700 nm. Quelle est l'origine de ces surenroulements ? Une indication précieuse est fournie par l'observation de chromosomes isolés à la métaphase mitotique et dont les histones ont été éliminées par un traitement chimique. Après ce traitement, on distingue une structure qui sert d'»armature» au chromosome et qui se colore fortement. On la voit sur la figure 16-7 et sur la figure qui sert d'en-tête au chapitre. Des boucles d'ADN forment des projections latérales à partir de cette armature. Les forts grossissements au microscope électronique montrent clairement que chaque boucle commmence et se termine au niveau de l'armature. On a découvert que l'armature des chromosomes métaphasiques est constituée en grande partie par l'enzyme topoisomérase II (voir page 331). Rappelons-nous qu'au Chapitre 11 nous avons appris que cette enzyme fait passer une double hélice d'ADN au travers d'une autre double hélice qu'elle a coupée. A l'évidence, l'armature centrale manipule l'écheveau embrouillé d'ADN pendant la réplication pour prévenir différents problèmes liés au désenlacement des brins de l'ADN, qui pourraient se poser à ce stade crucial. Il est désormais établi que l'armature centrale constitue un élément fondamental de l'organisation structurale et fonctionnelle des chromosomes eucaryotiques.

Revenons au surenroulement des chromosomes. De sérieux indices expérimentaux suggèrent que les solénoïdes soient disposés en boucles déployées à partir de l'armature centrale qui s'enroule elle-même pour former une spirale géante. L'aspect général de la structure est représenté sur la figure 16-8 qui montre l'enroulement quelque peu relâché d'un chromosome à l'interphase et l'enroulement beaucoup plus serré d'un chromosome métaphasique. Les boucles sont attachées à l'armature au niveau de régions particulières dites **d'attachement à l'armature** ou **SAR** (de l'anglais **Scaffold Attachment Regions**). En effet, quand la chromatine débarrassée des histones est traitée avec des enzymes de restriction, les boucles d'ADN se détachent de la chromatine, à l'exception de régions particulières. Ces régions sont résistantes à la digestion par des exonucléases parce qu'elles sont associées à des protéines. On a montré sur de la chromatine de *Drosophila* que quand les protéines sont digérées, les régions résistantes contiennent des séquences spécifiques de la fixation des topoisomérases.

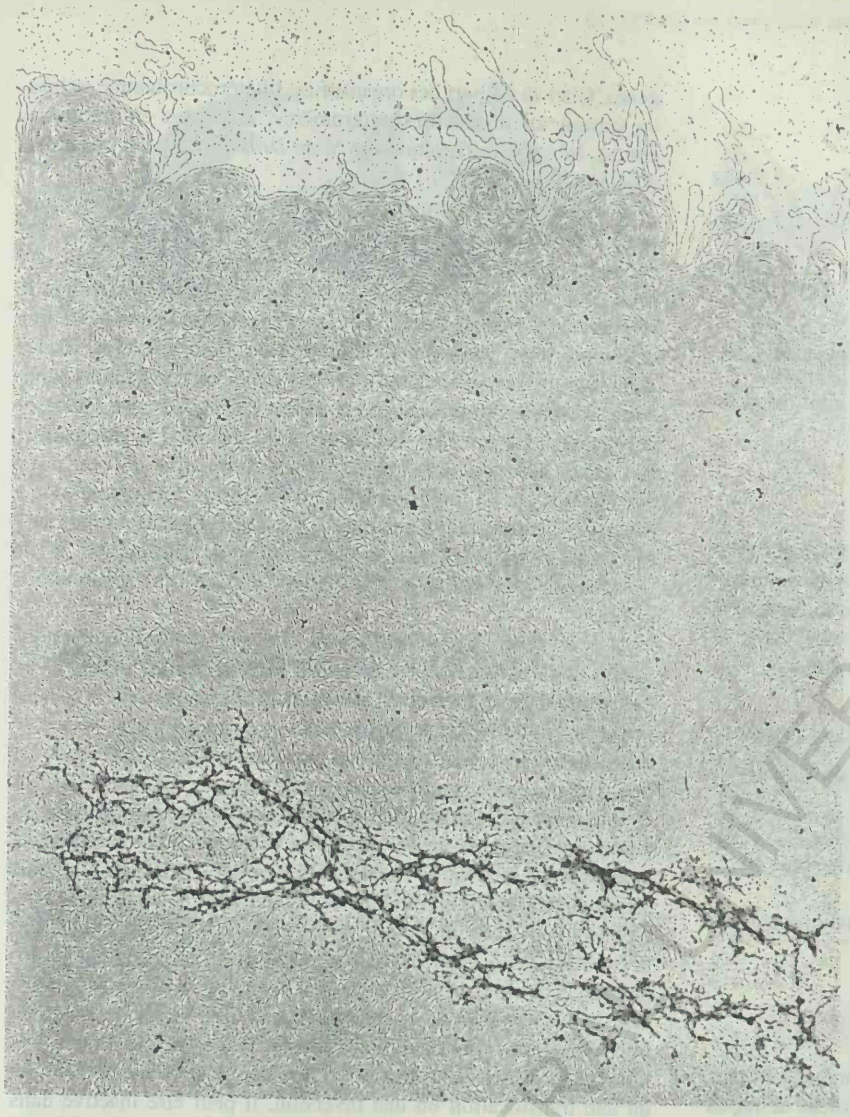


Figure 16-7. Microphotographie d'un chromosome à la métaphase, provenant d'une cellule humaine en culture. Observez l'armature centrale ou «cœur» à partir de laquelle les fibres d'ADN s'étendent en boucles vers l'extérieur. Aucun bout libre n'est visible à la périphérie. Des grossissements supérieurs permettent de voir que chaque boucle commence et finit dans la même région de l'armature. (Tiré de W.R. Baumbach et K.W. Adolph, *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology,* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1977.)

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

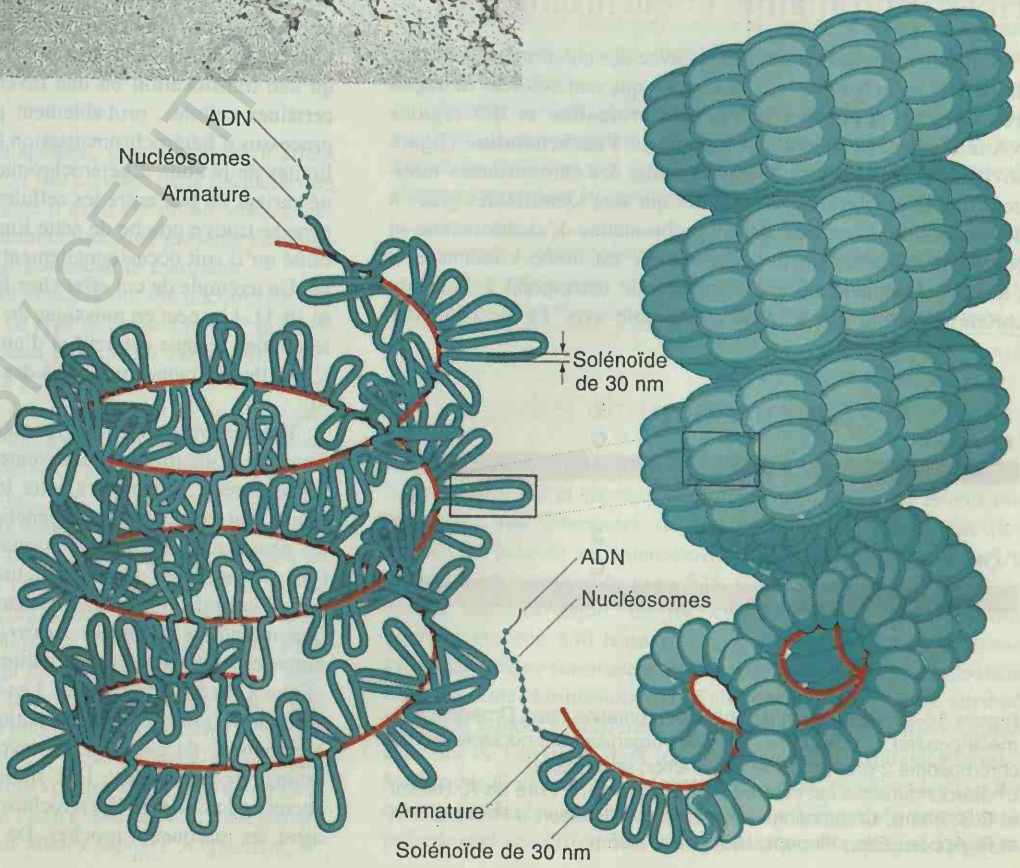


Figure 16-8. Modèle de la structure du chromosome. Un surenroulement relâché correspondant à la structure à l'interphase est montré à gauche. Le surenroulement beaucoup plus serré caractéristique de la métaphase est représenté a droite : les boucles y sont empilées de façon tellement dense que seules leurs extrémités sont visibles. Aux extrémités libres, on aperçoit une portion désenroulée du solénoïde qui permet d'apprécier la différence d'échelle.

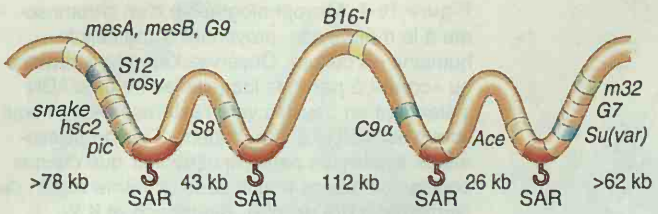


Figure 16-9. Quelques un des domaines correspondant à des boucles qui ont été cartographiés chez *Drosophila*. Les loci génétiques et les régions d'attachement à l'armature (SARs) sont indiqués.

Il est donc vraisemblable que ces régions sont les SAR qui attachent les boucles à l'armature. Quelques unes des boucles qui ont été cartographiées chez *Drosophila* sont montrées sur la figure 16-9. La taille de ces boucles varie entre 4,5 et 112 kb. Les SAR se trouvent toutes dans des régions non transcrites de l'ADN.

Message Il y a plusieurs niveaux d'emmagasinage de l'ADN.

1. L'ADN est enroulé autour de bobines d'histones dans les nucléosomes
2. La chaîne de nucléosomes s'enroule en solénoïde
3. La structure en solénoïde forme des boucles attachées à une armature centrale
4. L'armature et les boucles sont elles-mêmes surenroulées

Hétérochromatine et euchromatine

Le traitement des chromosomes avec des colorants spécifiques de l'ADN met en évidence des régions qui sont colorées de façon très intense, qu'on appelle l'**hétérochromatine** et des régions colorées plus faiblement qui constituent l'**euchromatine** (figure 16-10). Les expériences de cartographie des chromosomes montrent que la plupart des gènes actifs qui sont identifiables grâce à des mutations se trouvent dans l'euchromatine. L'euchromatine se colore moins intensément parce qu'elle est moins condensée et l'idée généralement acceptée est qu'elle correspond à l'état du chromosome qui est le plus compatible avec l'expression des

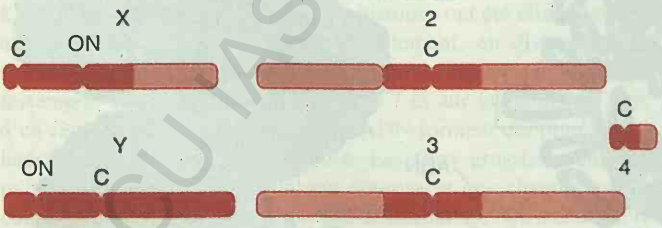


Figure 16-10. Distribution de l'hétérochromatine chez *Drosophila melanogaster*. C : centromères ; ON : organisateurs nucléolaires. Le chromosome 2 présente une constriction secondaire. L'hétérochromatine est colorée plus intensément. (Tiré de A. Hilliker et C.B. Sharp, *Chromosome Structure and Function*, J.P. Gustafson et R. Appels, Eds., Plenum, 1988, pp. 91-95.)

gènes. Chez la plupart des organismes, l'hétérochromatine se trouve surtout au niveau des centromères, mais des chromosomes entiers, tels que le chromosome Y de *Drosophila*, sont constitués d'hétérochromatine.

C'est chez *Drosophila* que les études les plus poussées des propriétés génétiques de l'hétérochromatine ont été réalisées. Par exemple, Arthur Hilliker a isolé des mutations létales dans des gènes qui sont localisés dans de l'hétérochromatine. Bien que la fonction de la plupart de ces gènes soit encore inconnue, le fait que des mutations dans l'hétérochromatine puissent être létales démontre que cette dernière n'est pas dépourvue d'activité génétique. La cartographie génétique indique toutefois que l'hétérochromatine contient 100 fois moins de gènes que l'euchromatine. Les gènes actifs localisés dans l'hétérochromatine doivent donc être séparés par de longues régions d'ADN non fonctionnel. Pour l'instant, retenons simplement qu'il y a une différence importante d'activité génétique entre les deux types de chromatine. Nous reviendrons plus loin sur les régions d'ADN qui séparent les gènes.

Une question majeure qui se pose à propos de l'architecture des chromosomes est de savoir en quoi l'hétérochromatine diffère de l'euchromatine et surtout de comprendre comment cette différence est maintenue. Une première différence, nous l'avons vu, est le degré de condensation. On ne sait pas encore si cette différence est la même que celle qui distingue le chromosome métaphasique du chromosome à l'interphase, c'est-à-dire un surenroulement plus ou moins serré (figure 16-8), ou si elle implique d'autres éléments structuraux. La question du maintien de cette différence d'organisation entre l'hétérochromatine et l'euchromatine reste aussi sans réponse, mais la façon dont le problème est abordé est intéressante car elle illustre bien l'approche génétique d'un problème biologique. Les travaux décrits ici s'effectuent sur *Drosophila* et utilisent le phénomène de panachure liée à des effets de position. Rappelons-nous que quand un gène est placé anormalement près d'un bloc d'hétérochromatine à la suite d'un remaniement tel qu'une translocation ou une inversion, il peut être inactivé dans certaines cellules, probablement parce qu'il est englobé dans le processus d'hétérochromatisation (page 233). Il est évident que les limites de la zone d'hétérochromatine d'un chromosome déterminé varient un peu entre les cellules d'un individu et qu'au plus un gène se trouve proche de cette limite, au plus grande est la probabilité qu'il soit occasionnellement recouvert par l'hétérochromatine. Un exemple de cet effet chez la Souris est montré dans la figure 16-11. L'aspect en mosaïque du tissu contenant des cellules dans lesquelles le gène est actif et d'autres dans lesquelles il est inactif s'appelle une panachure liée à des effets de position (voir Chapitre 8).

Thomas Grigliatti fit l'hypothèse que puisque la localisation de l'hétérochromatine est relativement constante chez les individus d'une espèce, la frontière entre les régions hétéro– et euchromatiques doit être déterminée génétiquement. Une façon d'identifier les gènes qui contrôlent la formation de l'hétérochromatine et le type de protéines pour lesquelles ils codent serait d'isoler des mutations qui suppriment la panachure due à des effets de position (des mutations désignées *Su(var)*, pour «Suppressors of variegation», en anglais) et des mutations qui l'amplifient (*E(var)*, pour «Enhancers of variegation»). Les suppresseurs devraient réduire la taille des régions hétérochromatiques et par conséquent, les gènes à proximité de ces régions devraient être englobés et inactivés moins fréquemment. Les mutations amplificateur devraient accroître la taille de l'hétérochromatine et inactiver plus fréquemment les marqueurs proches. De nombreuses mutations des deux

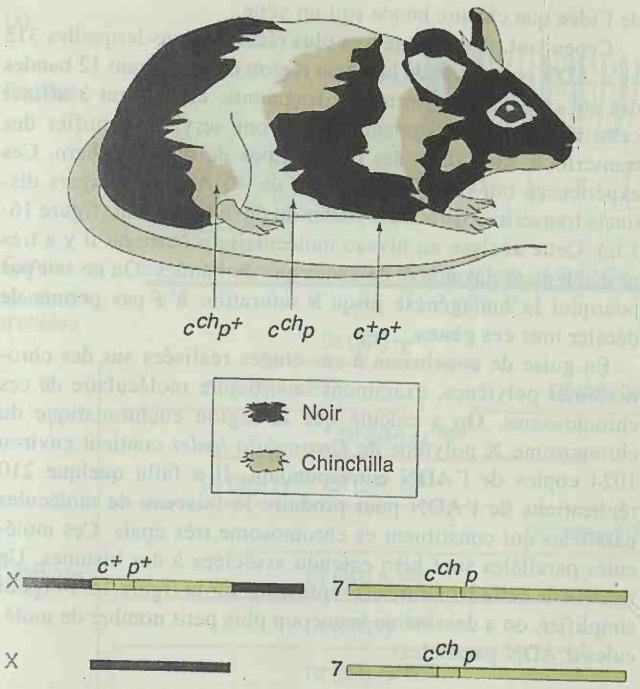


Figure 16-11. Panachure liée à des effets de position chez une souris femelle porteuse d'une translocation insertionnelle d'un segment du chromosome 7 sur lequel sont situés deux allèles déterminant la couleur du pelage. L'hétérochromatisation qui inactive le chromosome X affecte tantôt l'allèle c^{+}, ce qui produit un phénotype c^{ch} p^{+} beige, tantôt les deux allèles sauvages, produisant alors un phénotype c^{ch} p blanc. (D'après J.R.S. Fincham, *Genetic Analysis : Principles, Scope and Objectives*. Blackwell, London, 1994.)

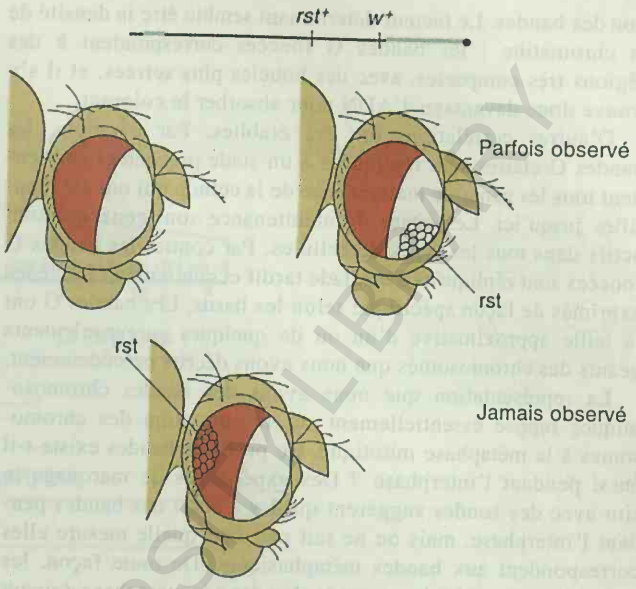


Figure 16-12. Quand l'allèle sauvage du gène *Su (var)* est présent en trois exemplaires, l'hétérochromatine déborde parfois sur le locus *rst* (texture rugueuse de l'oeil), ce qui produit un phénotype mutant rugueux. Remarquez que *rst* n'est jamais inactivé quand *w* est actif, ce qui montre que l'effet d'inactivation est progressif sur le chromosome. (D'après T.A. Grigliatti, *Methods in Cell Biology*, 35, 1991, 587.)

types furent obtenues après mutagénèse. Ces mutations n'affectaient pas seulement la proportion des cellules dans lesquelles un marqueur est inactivé, mais comme il avait été prédit, elles affectaient également la quantité d'hétérochromatine présente au voisinage de la bande chromosomique contenant le marqueur.

Quelques effets génétiques intéressants ont été découverts. Par exemple, la délétion d'un allèle de type sauvage *Su(var)*$^{+}$ qui produit donc des cellules ne contenant plus qu'un exemplaire fonctionnel de *Su(var)*$^{+}$, supprime la panachure au même titre que la présence d'un allèle mutant *Su(var)*. Inversement, si un allèle sauvage supplémentaire est introduit par duplication (les cellules contiennent alors trois gènes *Su(var)*$^{+}$), l'inactivation du gène marqueur est accrue, comme chez une mouche porteuse d'une mutation amplificateur *E(var)*. Il semble donc y avoir un effet de la dose génique, l'augmentation du nombre d'exemplaires de l'allèle *Su(var)*$^{+}$ s'accompagnant d'une production accrue d'hétérochromatine. Ce résultat suggère également que dans une cellule normale, le produit du gène responsable de la formation de l'hétérochromatine n'est disponible qu'en quantité limitée. Une autre découverte intéressante est que l'inactivation de gènes s'étend parfois au delà du marqueur analysé pour englober un autre locus. Par exemple, dans une souche normale, le gène *w* (oeil blanc) est parfois inactivé par l'hétérochromatine voisine, mais le gène *rst* (texture rugueuse de l'oeil) qui est de l'autre côté de *w* ne l'est jamais. Dans les lignées porteuses de trois allèles *Su(var)*$^{+}$, cependant, w^{+} est inactivé dans 75 pour cent des cellules et rst^{+} est inactivé en même temps dans 30 pour cent des cas (figure 16-12). Ceci montre clairement l'effet d'un accroissement de l'étendue de la région hétérochromatisée.

Les gènes *Su(var)* et *E(var)* ont été isolés et leur séquençage est en cours. Leurs produits appartiennent sans aucun doute à une classe de protéines qui sont impliquées dans l'assemblage de la chromatine et dans la condensation des chromosomes.

Message L'euchromatine contient la plupart des gènes actifs. L'hétérochromatine est plus condensée et ses extrémités recouvrent parfois des gènes proches qui sont alors inactivés.

Les bandes chromosomiques

Un des profils de bandes chromosomiques les plus utilisés est celui produit par le Giemsa, un colorant de l'ADN. Ce réactif fait apparaître une alternance de régions colorées légèrement (les bandes G claires) ou intensément (les bandes G foncées). Un exemple est montré à la page 525. Chaque espèce a un profil de bandes caractéristique. Le jeu des 23 chromosomes humains contient environ 850 bandes G foncées visibles à la métaphase mitotique. Elles fournissent un système très utile de subdivision des différents chromosomes en régions et un numéro a été attribué à chaque bande. La différence d'intensité de la coloration semble provenir de variations dans les proportions des différentes bases : les bandes G claires sont relativement riches en paires G•C et les bandes G foncées sont riches en paires A•T. Toutefois, on estime à présent que ces différences ne suffisent pas à expliquer l'appari-

tion des bandes. Le facteur déterminant semble être la densité de la chromatine : les bandes G foncées correspondent à des régions très compactes, avec des boucles plus serrées, et il s'y trouve donc davantage d'ADN pour absorber le colorant.

D'autres corrélations ont été établies. Par exemple, les bandes G claires sont répliquées à un stade précoce et contiennent tous les gènes de maintenance de la cellule qui ont été identifiés jusqu'ici. Les gènes de maintenance sont ceux qui sont actifs dans tous les types de cellules. Par contre, les bandes G foncées sont répliquées à un stade tardif et contiennent les gènes exprimés de façon spécifique selon les tissus. Les bandes G ont la taille approximative d'un ou de quelques surenroulements géants des chromosomes que nous avons décrits précédemment.

La représentation que nous avons des bandes chromosomiques repose essentiellement sur la coloration des chromosomes à la métaphase mitotique. Ce profil de bandes existe-t-il aussi pendant l'interphase ? Des expériences de marquage in situ avec des sondes suggèrent qu'il y a aussi des bandes pendant l'interphase, mais on ne sait pas dans quelle mesure elles correspondent aux bandes métaphasiques. De toute façon, les domaines mis en évidence par les bandes à la métaphase doivent évidemment se trouver dans le même ordre relatif dans les chromosomes à l'interphase, qu'ils soient dans des bandes ou non.

Il est intéressant de se demander si la position relative des bandes a une signification fonctionnelle quelconque. Nous avons vu dans le chapitre 8 que les mammifères ont conservé de nombreux «blocs» de bandes à travers les différentes lignées apparues au cours de l'évolution. Malheureusement, ceci ne nous dit pas si cette conservation reflète l'existence d'un groupement fonctionnel essentiel des bandes ou si les ciseaux de l'évolution n'ont tout simplement pas encore eu le temps de découper et de remanier les groupes de bandes.

Le profil de bandes probablement le plus spectaculaire et qui continue de fasciner les généticiens est celui des chromosomes géants des glandes salivaires des larves de diptères et en particulier de la drosophile. Chacun de ces chromosomes présente une alternance caractéristique de bandes transversales foncées et claires très faciles à observer. Une des premières questions qui fut posée était de savoir ce que les bandes représentaient et une des premières suggestions fut que chaque bande corresponde à un gène. Cette hypothèse fut testée par plusieurs groupes de chercheurs qui utilisèrent l'approche de la **mutagénèse jusqu'à saturation**. La logique de cette approche est la suivante : si une collection importante de mutations est produite dans une région limitée du chromosome caractérisée par la présence d'un nombre de bandes bien établi, il est raisonnable de supposer que tous les gènes de cette région seront affectés par les mutations. Dès lors, une fois que le nombre total de gènes a été déterminé en classant génétiquement ces mutations dans des groupes de complémentation, si l'hypothèse d'un gène – une bande est correcte, le nombre de gènes devrait être égal au nombre de bandes.

Une étude de ce type a été réalisée en 1979, dans le laboratoire d'Arthur Chovnick, en utilisant la région autour du gène *rosy* (qui affecte la couleur de l'oeil) sur le chromosome 3. Cette région est désignée 87D2–4 à 87E12–F1 et elle recouvre 23 bandes polytènes. Les généticiens ont isolé 153 mutations létales récessives dans cette région. Ils ont ensuite utilisé des tests de complémentation et une collection de délétions pour grouper les mutations au sein de gènes. Ils ont identifié 21 groupes de complémentation (donc 21 gènes) comme le montre la figure 16-13a. La correspondance avec le nombre de bandes est relativement bonne, ce qui constitue un argument en faveur de l'idée que chaque bande soit un gène.

Cependant, des expériences plus récentes dans lesquelles 315 kb d'ADN provenant de la même région et recouvrant 12 bandes ont été clonées sous forme de fragments, conduisent à affiner cette notion. Ces fragments clonés ont servi à identifier des transcrits d'ARN dans des hybridations de type Northern. Ces expériences ont révélé l'existence de 40 ARN messagers distincts transcrits à différents stades du développement (figure 16-13c). Cette analyse au niveau moléculaire montre qu'il y a très probablement davantage de gènes que de bandes. On ne sait pas pourquoi la mutagénèse jusqu'à saturation n'a pas permis de déceler tous ces gènes.

En guise de conclusion à ces études réalisées sur des chromosomes polytènes, examinons la structure moléculaire de ces chromosomes. On a calculé que la région euchromatique du chromosome X polytène de *Drosophila hydei* contient environ 1024 copies de l'ADN correspondant. Il a fallu quelque 210 réplications de l'ADN pour produire le faisceau de molécules parallèles qui constituent ce chromosome très épais. Ces molécules parallèles sont bien entendu associées à des histones. Un modèle de cette structure est représenté sur la figure 16-14 (pour simplifier, on a dessiné un beaucoup plus petit nombre de molécules d'ADN parallèles).

L'ADN du centromère

Le centromère est un des points de repère importants sur un chromosome. Il s'agit d'un étranglement qui devient visible pendant la division nucléaire et qui sert de point d'attachement aux fibres du fuseau. La technologie de l'ADN recombinant a permis d'étudier la structure moléculaire du centromère. Louise Clarke et John Carbon ont ouvert la voie en isolant et en séquençant le centromère du chromosome 3 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'étude a commencé par le clonage des gènes *LEU2* et *CDC10* qui sont étroitement liés et qui sont situés de part et d'autre du centromère du chromosome 3 (CEN3). Un marche sur le chromosome a permis d'ordonner une série de fragments d'ADN correspondant à la région qui sépare les deux gènes. Les fragments ont ensuite été clonés individuellement dans un plasmide de levure artificiel pour voir s'ils lui conféraient la capacité de ségréger correctement à la méiose. Il s'agissait en fait de voir si le plasmide se comportait à la méiose comme le chromosome surnuméraire d'un aneuploïde disomique. En l'absence de séquence centromérique, le plasmide était présent dans les quatre ascospores, mais en présence de certains fragments de la région *LEU2 – CDC10*, le plasmide ségrégeait selon un rapport 2+ : 2-. Ce profil 2 : 2 montre que le plasmide est emmené vers un des pôles à la première division méiotique et qu'une séparation comme celle que subissent les chromatides a lieu à la seconde division, exactement comme dans le cas d'un chromosome aneuploïdique surnuméraire. Le séquençage de l'ADN du centromère du chromosome 3 et des centromères d'autres chromosomes a mis en lumière l'existence de caractéristiques communes qui sont décrites sur la figure 16-15. La création de délétions et la mutagénèse in vitro ont montré que les régions I, II et III du centromère sont indispensables pour la ségrégation. Ces régions servent probablement à fixer les protéines qui s'attachent aux fibres du fuseau (figure 16-16).

Qu'arrive-t-il à l'ADN du centromère lors de la première division méiotique, quand le centromère ne se divise pas ? On pense que la structure particulière du centromère bloque localement la réplication de l'ADN, ce qui produirait une situation du type de

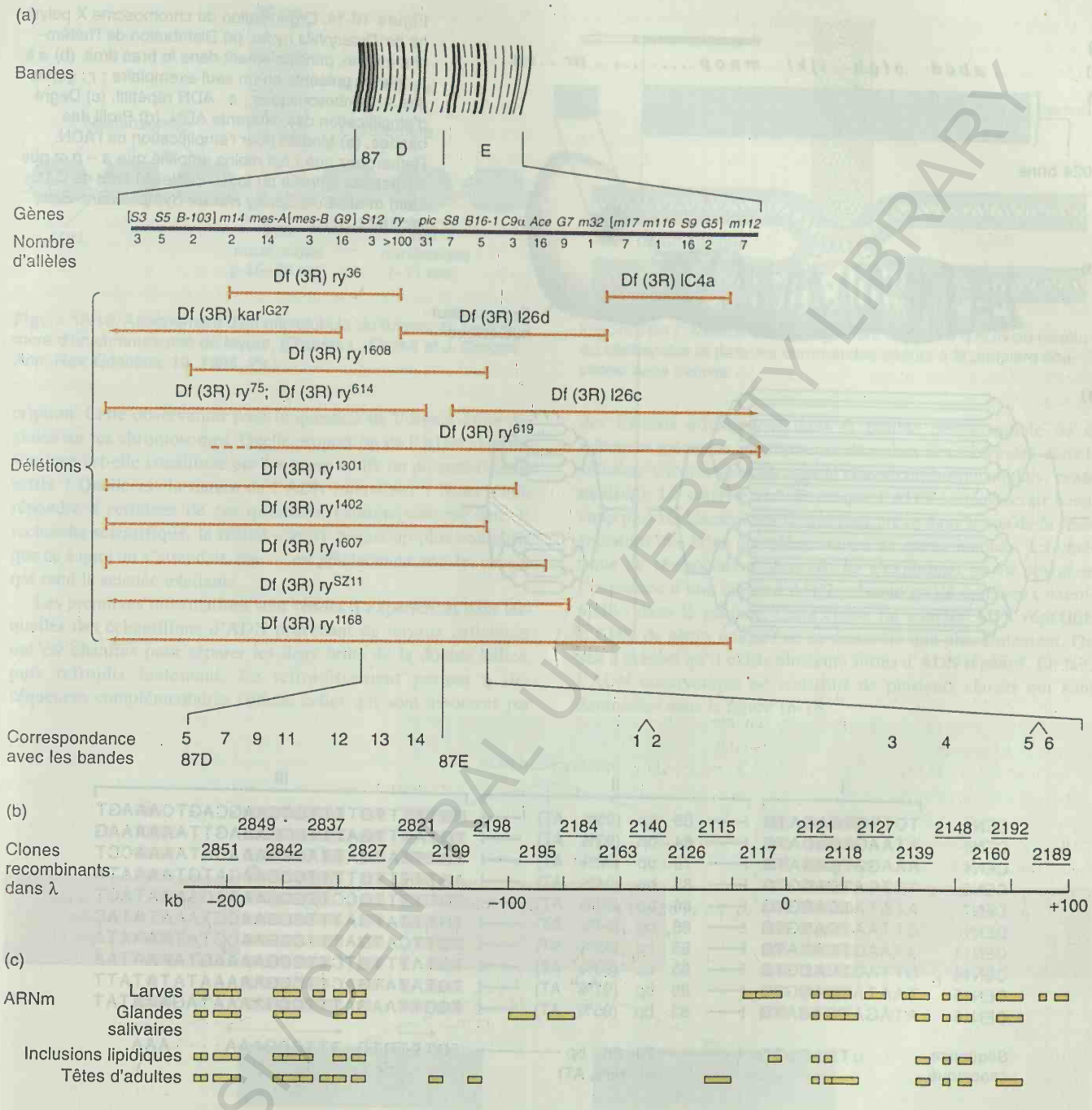


Figure 16-13. Relation entre gènes, bandes polytènes et unités de transcription dans la région 87D/E du chromosome 3 de *Drosophila*. (a) Position des bandes et des gènes. 153 mutations létales localisées dans cette région ont été réparties en 20 groupes de complémentation (gènes). Les parenthèses indiquent des incertitudes quant à l'ordre. Les délétions ont servi à positionner les gènes. (b) Clones d'ADN utilisés comme sondes sur des transferts de type Northern. (c) ARN messagers détectés par les sondes dans différents tissus. (Partie (a) d'après A.J. Hilliker et al., *Genetics*, 95, 1980, 95-110 ; parties (b) et (c) d'après B. Bossy et al., *Eur. Mol. Biol. Org. J.*, 3, 1984, 2537.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

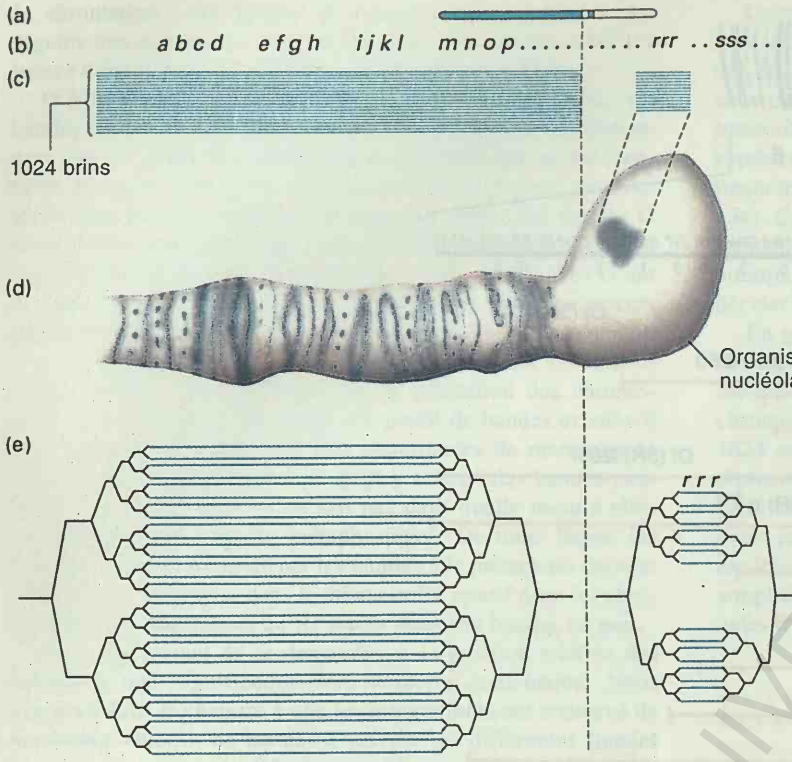


Figure 16-14. Organisation du chromosome X polytène de *Drosophila hydei*. (a) Distribution de l'hétérochromatine, principalement dans le bras droit. (b) *a* à *p* : gènes présents en un seul exemplaire ; *r* : gènes des ARN ribosomiques ; *s* : ADN répétitif. (c) Degré d'amplification des différents ADN. (d) Profil des bandes. (e) Modèle pour l'amplification de l'ADN. Remarquez que *r* est moins amplifié que *a* – *p* et que *s* n'est pas amplifié du tout. (Partie (e) tirée de C.D. Laird et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 38, 1973, 311.)

	I	II	III
CEN1	TCTTGTCACATG	85 bp (95% AT)	TGTTTTTGTTTTCCGAAGCAGTCAAAGT
CEN3	ATAAGTCACATG	84 bp (93% AT)	TGTATTTGATTTCCGAAAGTTAAAAAAG
CEN4	AAAGGTCACATG	78 bp (92% AT)	TGTTTATGATTACCGAAACATAAAACCT
CEN6	TTTCATCACGTG	85 bp (94% AT)	AGTTTTTGTTTTCCGAAGATGTAAAATA
CEN7	ATATATCACGTG	86 bp (93% AT)	TGTTTTTGCCTTCCGAAAAGAAAATAGT
CEN10	CTTAATCACGTG	86 bp (94% AT)	TGTTTATGATTTCCGAACCTAAATATAC
CEN11	ATAAGTCACATG	85 bp (95% AT)	TGTTCATGATTTCCGAACGTATAAAATA
CEN14	GTTAGTCACGTG	85 bp (93% AT)	TGTATTTGTCTTCCGAAAAGTAAAATAA
CEN15	TAATATCACGTG	86 bp (91% AT)	TGTATATGACTTCCGAAAAATATATATT
CEN16	ATAGATCACATG	83 bp (95% AT)	TGGTTAAGATTTCCGAAAATAGAAATAT
Séquence canonique	uTCACuTG	78–86 bp (91–95% AT)	TGTTTRTG · TTTCCGAAA · · · · AAA

Figure 16-15. Séquences des centromères de dix chromosomes de levure. Tous contiennent trois éléments de base, I, II et III. Les nucléotides conservés sont surlignés et repris dans une séquence canonique au bas de la figure, dans laquelle u désigne A ou G et R désigne A ou T. Les flèches au-dessus de la séquence canonique indiquent une répétition inversée qui pourrait être importante pour la fixation d'une protéine. (D'après L. Clarke et J. Carbon, *Ann. Rev. Genetics*, 19, 1985, 29.)

celle décrite sur la figure 16-17. Cette hypothèse est confortée par l'observation que les fragments d'ADN porteurs d'un centromère ne peuvent pas servir d'origine de réplication quand on les introduit dans des plasmides construits spécialement pour tester cette propriété. Il faut qu'un vague de réplication initiée ailleurs atteigne le centromère pour que sa réplication commence, et cette réplication ne s'achève qu'au stade de la deuxième anaphase.

L'organisation des séquences sur le chromosome

L'analyse des ARN messagers correspondant à la région du chromosome de drosophile montrée sur la figure 16-13 établit clairement que des régions non transcrites séparent les unités de trans-

BCU ASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

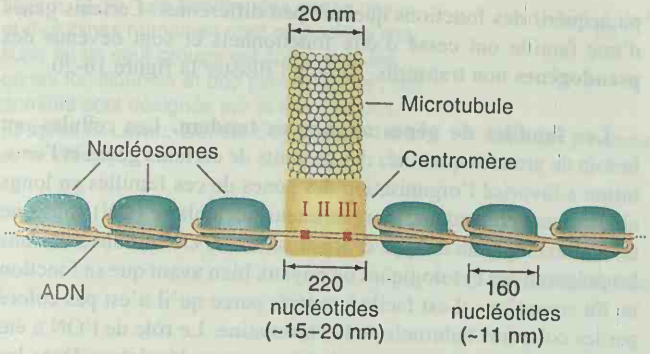


Figure 16-16. Attachement d'un microtubule du fuseau au centromère d'un chromosome de levure. (D'après L. Clarke et J. Carbon, *Ann. Rev. Genetics*, 19, 1985, 29.)

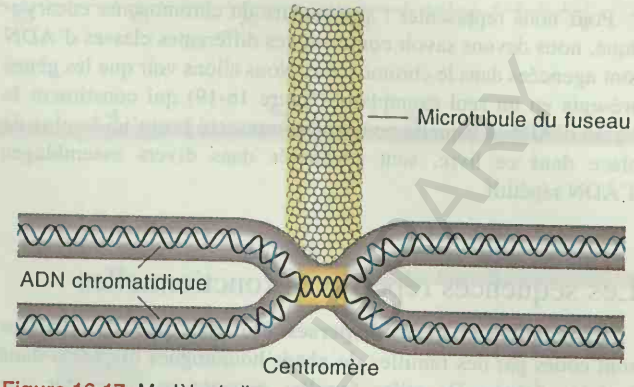


Figure 16-17. Modèle de l'arrangement des brins d'ADN au niveau du centromère et dans les chromatides soeurs à la première anaphase de la méiose.

cription. Cette observation pose la question de l'organisation des gènes sur les chromosomes. Quelle proportion de l'ADN chromosomique est-elle constituée par les gènes actifs ou potentiellement actifs ? Quelle est la nature de l'ADN interstitiel ? Nous allons répondre à certaines de ces questions. Comme souvent dans la recherche scientifique, la réalité s'avère beaucoup plus complexe que ce à quoi on s'attendait, mais c'est précisément une des choses qui rend la science excitante.

Les premières informations sont venues d'expériences dans lesquelles des échantillons d'ADN provenant de noyaux cellulaires ont été chauffés pour séparer les deux brins de la double hélice, puis refroidis lentement. Le refroidissement permet à des séquences complémentaires comme celles qui sont associées par des liaisons d'hydrogène dans la double hélice initiale de se retrouver grâce aux mouvements aléatoires des molécules dans la solution. Ce processus est appelé **réassociation** (en anglais, **reannealing**). La surprise vint de ce que l'ADN se réassociait beaucoup plus rapidement que ce qui était prévu dans le cas de la réassociation des brins complémentaires de gènes uniques. La cinétique de réassociation observée ne s'expliquait qu'en postulant l'existence d'une classe d'ADN présente en de nombreux exemplaires dans le génome. Cette classe fut appelée **ADN répétitif**. L'ADN de gènes uniques ne se réassocie que plus lentement. On sait à présent qu'il existe plusieurs sortes d'ADN répétitif. En fait, l'ADN eucaryotique est constitué de plusieurs classes qui sont énumérées dans la figure 16-18.

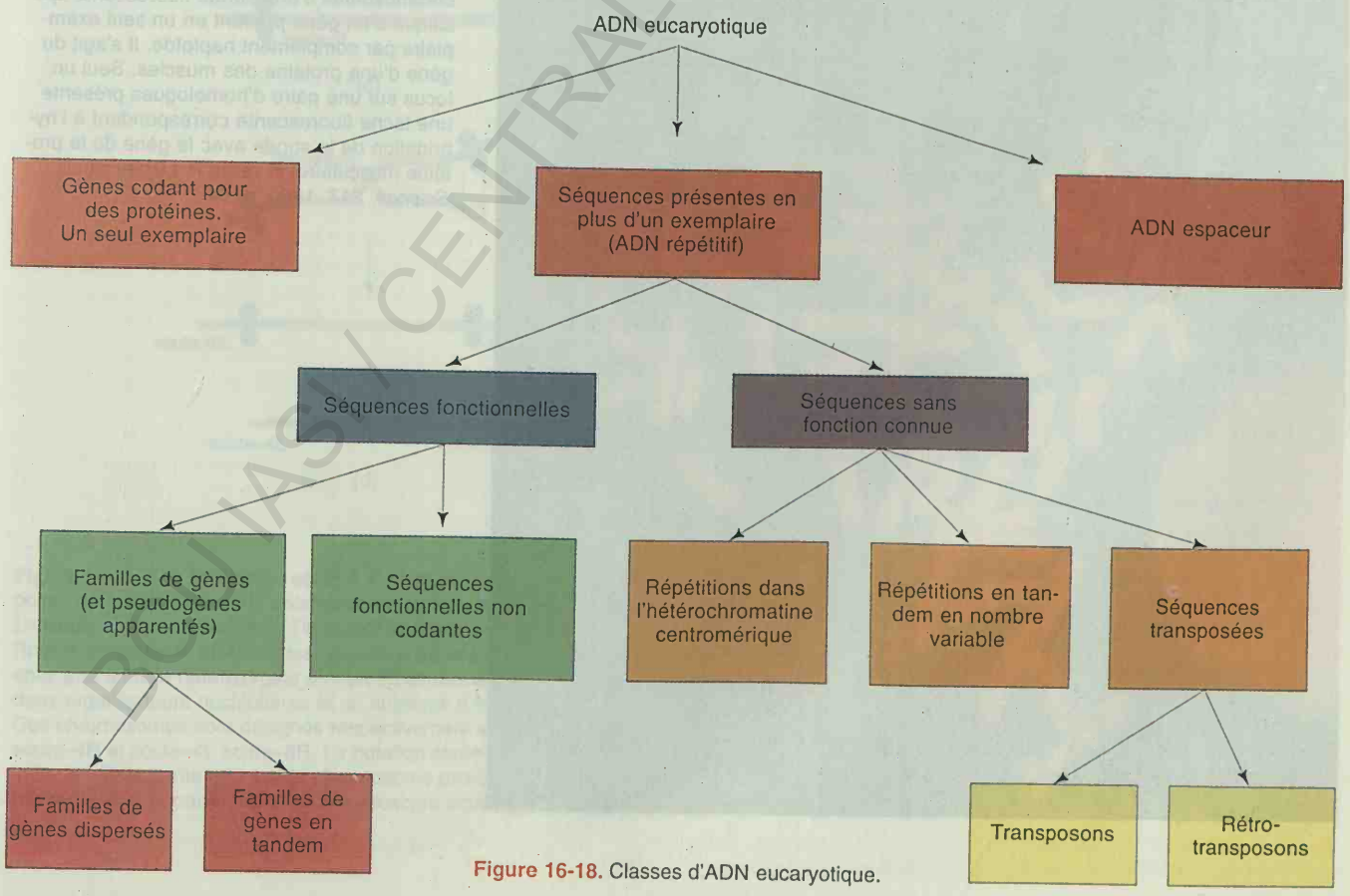


Figure 16-18. Classes d'ADN eucaryotique.

BOLIVIAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pour nous représenter l'architecture du chromosome eucaryotique, nous devons savoir comment ces différentes classes d'ADN sont agencées dans le chromosome. Nous allons voir que les gènes présents en un seul exemplaire (figure 16-19) qui constituent la classe d'ADN à laquelle nous avons consacré jusqu'ici le plus de place dans ce livre, sont enchâssés dans divers assemblages d'ADN répétitif.

Les séquences répétitives fonctionnelles

Les familles de gènes dispersés. Plusieurs types de protéines sont codés par des familles de gènes homologues dispersés dans tout le génome. De telles familles peuvent ne comporter que quelques gènes ou au contraire en compter beaucoup, comme le montrent quelques exemples : les actines, de 5 à 30 gènes ; les kératines, plus de 20 ; la chaîne lourde de la myosine, de 5 à 10 ; les tubulines, de 3 à 15 ; les protéines des coquilles d'oeufs d'insectes, 50 ; les globines, jusqu'à 5 ; la région variable des immunoglobulines, 500 ; l'ovalbumine, 3 ; et les histones, de 100 à 1000. Les séquences nucléotidiques des gènes d'une famille peuvent diverger comme dans le cas des gènes d'hémoglobine humaine qui ont été étudiés à la page 222, et les gènes homologues ont pu acquérir des fonctions quelque peu différentes. Certains gènes d'une famille ont cessé d'être fonctionnels et sont devenus des **pseudogènes** non transcrits, comme l'illustre la figure 16-20.

Les familles de gènes alignés en tandem. Les cellules ont besoin de grandes quantités des produits de certains gènes et l'évolution a favorisé l'organisation des gènes de ces familles en longs alignements en tandem. L'organisateur nucléolaire (ON) constitue un bon exemple de ce type d'organisation. L'ON fut observé dans les préparations cytologiques de noyaux bien avant que sa fonction ne fût comprise ; il est facile à repérér parce qu'il n'est pas coloré par les colorants habituels de la chromatine. Le rôle de l'ON a été révélé par une série d'études génétiques et moléculaires. Dans les années 1960, on a émis l'hypothèse que l'ON soit constitué d'alignements en tandem de gènes codant pour l'ARNr. Ferruccio Ritossa et Sol Spiegelman ont testé cette hypothèse en construisant des souches de *Drosophila* possédant différents nombres de régions ON par cellule. Chez *Drosophila melanogaster*, l'ON est situé dans l'hétérochromatine proximale du chromosome X et dans le bras le plus court du chromosome Y. (Le chromosome X de *Drosophila* est représenté conventionnellement avec la région distale à gauche et la région proximale et le centromère à droite. Nous nous réfèrerons à cette orientation conventionnelle pour définir les

Figure 16-19. Hybridation in situ sur des chromosomes d'une sonde fluorescente spécifique d'un gène présent en un seul exemplaire par complément haploïde. Il s'agit du gène d'une protéine des muscles. Seul un locus sur une paire d'homologues présente une tache fluorescente correspondant à l'hybridation de la sonde avec le gène de la protéine musculaire. (Tiré de P. Lichter et al., *Science*, 247, 1990, p. 64.)

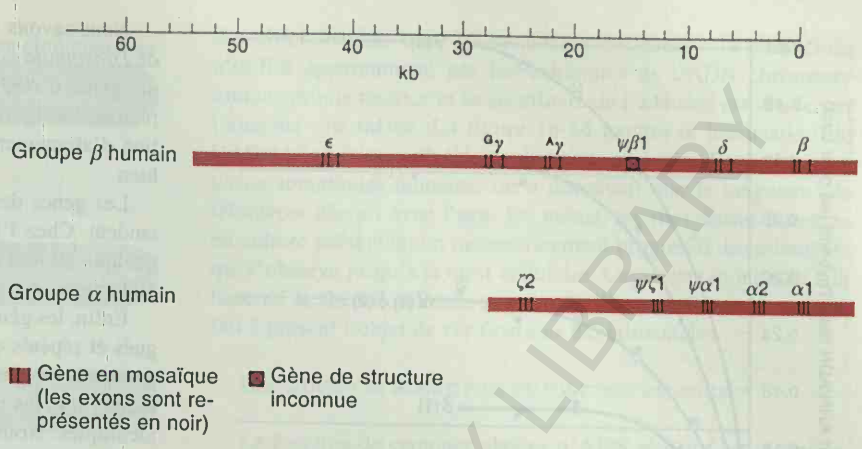


Figure 16-20. Les familles des gènes des α- et β-globines humaines sont organisées chacune en un seul groupe qui comprend des gènes fonctionnels et des pseudogènes ; ces derniers sont désignés par la lettre ψ (psi). (D'après B. Lewin, *Genes*. Copyright © 1983 John Wiley.)

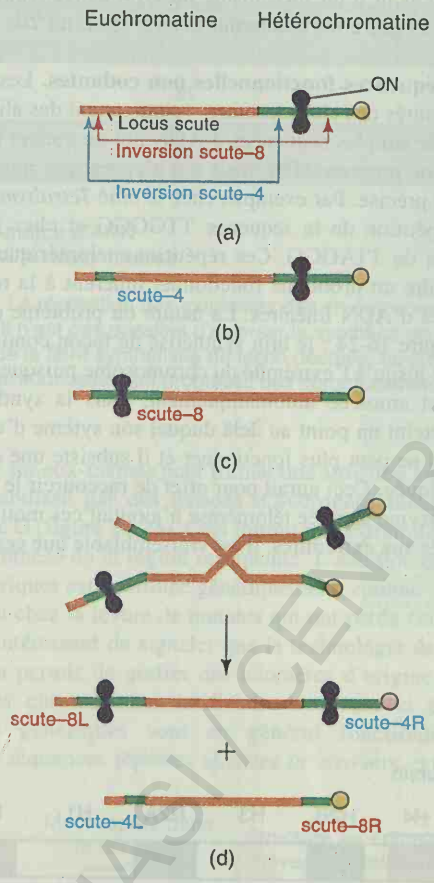


Figure 16-21. Les inversions scute-4 et scute-8. (a) Position des points de rupture des deux inversions sur le chromosome X de *Drosophila*. (b) Le résultat de l'inversion scute–4. (c) Le résultat de l'inversion scute–8. (d) Un crossing-over entre scute–4 et scute–8 chez une femelle hétérozygote produit un chromosome qui contient deux organisateurs nucléolaires et un autre qui n'en contient aucun. Ces chromosomes sont désignés respectivement scute–8L scute–4R et scute–4L scute–8R. La notation scute–8L scute–4R indique que la partie gauche du chromosome provient du chromosome scute–8 et la partie droite du chromosome scute–4.

localisations chromosomiques.) Il existe plusieurs mutants de *Drosophila* possédant dans le chromosome X des inversions dont le point de rupture gauche se trouve près du locus «scute» et le point de rupture droit, dans la région proximale ; ces mutations sont désignées d'après le phénotype **scute** qu'elles confèrent (un nombre réduit de soies). Le point de rupture droit de l'inversion scute-8 se trouve entre ON et le centromère ; celui de l'inversion scute-4 se trouve en position distale par rapport à ON (figure 16-21). Au départ de femelles hétérozygotes pour scute–4 et scute–8, il est possible d'isoler des individus qui, à la suite d'un crossing-over, possèdent soit deux soit zéro régions ON. Par des croisements appropriés, on peut alors produire des individus possédant différents nombres d'ON par cellule (tableau 16-2). Par des expériences d'hybridation moléculaire d'ARN ribosomique radioactif avec des quantités connues d'ADN total, Ritossa et Spiegelman mesurèrent la fraction de cet ADN qui s'hybride à l'ARN ribosomique. Ils découvrirent une relation linéaire entre le nombre de régions ON par cellule et la quantité d'ARNr 18S et 28S hybridée (figure 16-22). Ce résultat démontrait la localisation dans la région ON des loci codant les ARNr. (Par la suite, des expériences d'hybridation in situ ont confirmé que l'ADN correspondant aux ARNr est localisé dans l'ON.) Connaissant la taille des ARNr 18S et 28S

Tableau 16-2. Compléments chromosomiques présentant des nombres différents d'ON par cellule

Chromosomes	Nombre d'ON par cellule
scute–4L scute–8R/Y♂	1
scute–4L scute–8R/X♀	1
sauvage X/Y♂	2
sauvage X/X♀	2
scute–8L scute–4R/X♀	3
scute–8L scute–4R/scute–8L scute–4R♀	4

NOTE : le symbole X indique ici un chromosome X sauvage donc ne portant pas les inversions scute.

IIASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

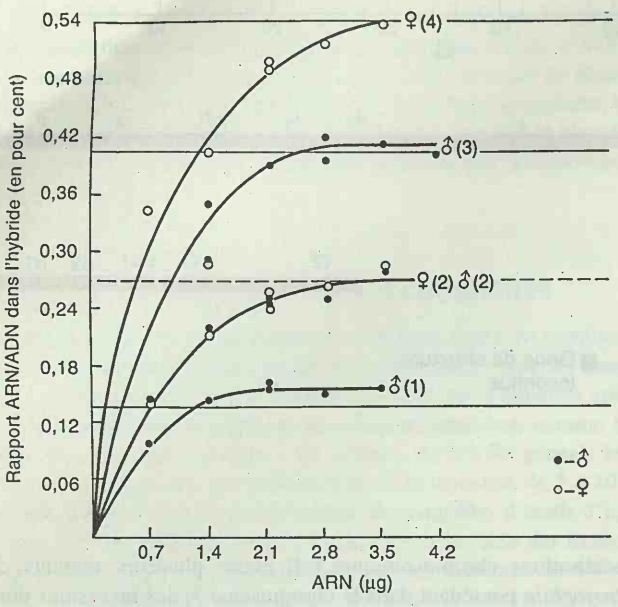


Figure 16-22. La quantité d'ARN ribosomique (ARNr) qui s'hybride avec une quantité constante d'ADN. Un plateau est atteint quand tout l'ADN complémentaire à l'ARNr est hybridé. Chaque courbe correspond à un échantillon d'ADN provenant d'individus caractérisés par un nombre déterminé (indiqué entre parenthèses) d'organisateurs nucléolaires (ON) par cellule. (Tiré de F.M. Ritossa et S. Spiegelman, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 53, 1965,737.)

et le pourcentage de l'ADN total qui s'hybride avec eux, nous pouvons estimer le nombre de gènes codant pour l'ARNr à environ 200 par ON. Manifestement, une redondance d'une telle ampleur constitue une façon d'assurer la présence d'une grande quantité d'ARNr dans la cellule.

Message L'organisateur nucléolaire (ON) est une région de l'hétérochromatine définissable cytologiquement. Elle contient des alignements en tandem de gènes codant pour les ARN ribosomiques.

Nous savons maintenant que les ON des chromosomes X et Y de *Drosophila* contiennent respectivement 250 et 150 exemplaires des gènes d'ARNr. Un ON humain en contient environ 250 exemplaires. La figure 13-4 est une microphotographie de la transcription d'alignements en tandem de gènes d'ARNr chez un amphibien.

Les gènes des ARNt sont un autre exemple d'alignements en tandem. Chez l'Homme, les gènes des différents ARNt occupent quelque 50 loci chromosomiques et chaque locus contient de 10 à 100 copies.

Enfin, les gènes des histones de certaines espèces sont aussi alignés et répétés en tandem (figure 16-23). Le séquençage des alignements de gènes d'histones et d'autres alignements en tandem a montré que les multiples copies des gènes qu'ils contiennent sont identiques. Nous nous serions attendus à ce que des mutations à certaines positions non cruciales aient introduit quelques différences. Comme ce n'est pas le cas, il doit exister un mécanisme qui assure l'invariance des membres de l'alignement. Il s'agit vraisemblablement d'un mécanisme du type conversion génique, un phénomène que nous étudierons dans le chapitre 20.

Les séquences fonctionnelles non codantes. Les télomères – les extrémités des chromosomes – contiennent des alignements en tandem de simples séquences d'ADN qui ne codent pas pour une protéine ou pour un ARN, mais qui n'en ont pas moins une fonction bien précise. Par exemple, chez le cilié *Tetrahymena*, on trouve la répétition de la séquence TTGGGG et chez l'Homme, la répétition de TTAGGG. Ces répétitions télomériques permettent de résoudre un problème fonctionnel inhérent à la réplication de molécules d'ADN linéaires. La nature du problème est expliquée sur la figure 16-24 : le brin synthétisé de façon continue peut être prolongé jusqu'à l'extrémité du chromosome puisque sa polymérisation est amorcée automatiquement, mais la synthèse du brin décalé atteint un point au delà duquel son sytème d'amorçage par des ARN ne peut plus fonctionner et il subsiste une courte région non répliquée. Ceci aurait pour effet de raccourcir le chromosome si une enzyme appelée télomérase n'ajoutait ces motifs de séquence répétés aux extrémités. Il est vraisemblable que ces motifs ajou-

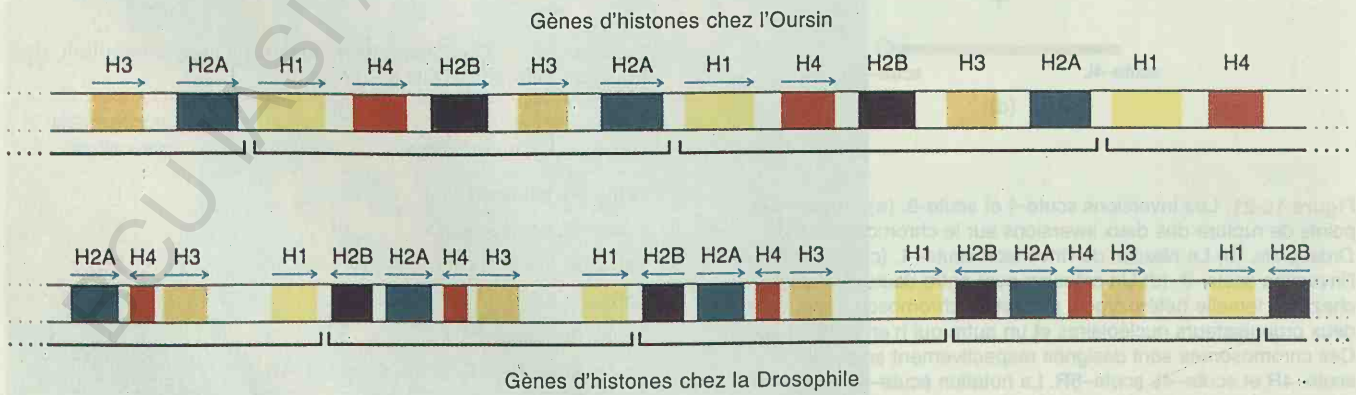


Figure 16-23. Répétitions en tandem des gènes d'histones chez l'Oursin et chez la Drosophile. Seule une petite partie des répétitions est représentée. Les flèches indiquent le sens de la transcription.

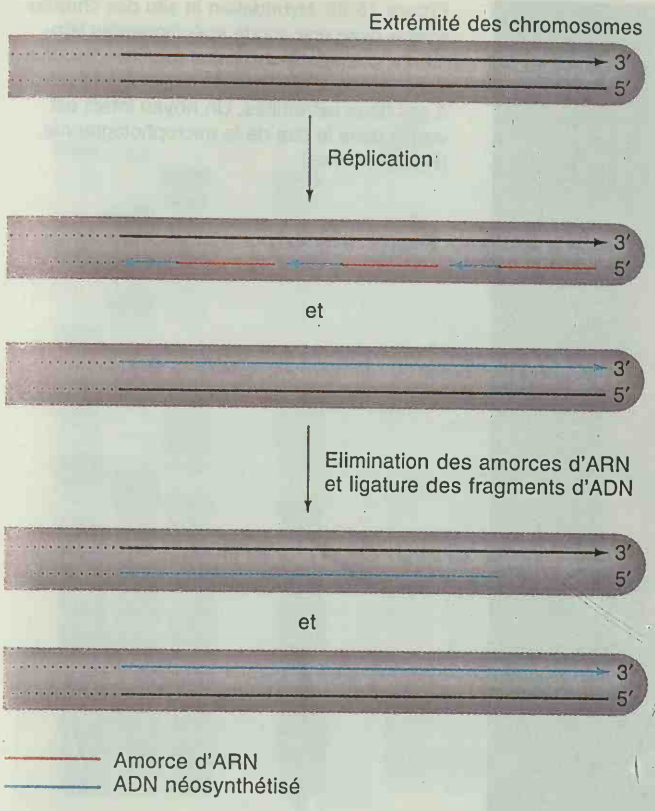


Figure 16-24. La réplication des extrémités des chromosomes pose un problème. Il n'est pas possible d'amorcer la synthèse de la dernière portion de la fibre synthétisée de façon décalée, ce qui devrait entraîner un raccourcissement progressif des chromosomes.

tés se replient sur eux-mêmes pour former une structure en épingle à cheveux stabilisée par des liaisons d'hydrogène inhabituelles entre paires de G (figure 16-25). Ceci fournit une extrémité 3' pour amorcer la synthèse de la région manquante. L'addition des répétitions télomériques est contrôlée génétiquement, comme l'a montré l'isolement chez la levure de mutants qui ont perdu cette régulation. Il est intéressant de signaler que la technologie de l'ADN recombinant a permis de greffer des télomères d'origine hétérologue sur des chromosomes artificiels de levure et que ces constructions génétiques sont en général fonctionnelles ! Toutefois, les séquences répétées ajoutées *in vivo* aux extrémités

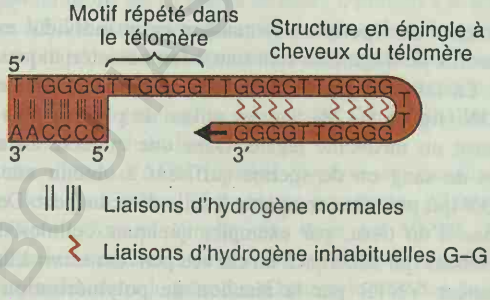


Figure 16-25. Modèle qui montre comment les répétitions télomériques résolvent le problème de la réplication des extrémités des chromosomes. En se repliant en forme d'épingle à cheveux grâce à la formation de liaisons d'hydrogène entre G, l'ADN amorce sa propre réplication.

des chromosomes sont des séquences de levure : la télomérase n'utilise apparemment pas les extrémités de l'ADN chromosomique comme matrice et la spécificité de l'addition est dictée par l'enzyme elle-même. La figure 16-26 montre la localisation de l'ADN télomérique, révélée par hybridation *in situ*. Dans plusieurs tissus somatiques humains, on a découvert que la longueur des télomères décroît avec l'age. De même, les fibroblastes humains en culture présentent un racourcissement progressif des télomères qui s'observe jusqu'à la mort cellulaire. Ces observations sont à la base de la théorie télomérique du vieillissement dont la validité fait à présent l'objet de vérifications expérimentales.

Les sequences repetitives de fonction inconnue

La fonction de certaines classes d'ADN répétitif est inconnue. Il s'agit en général de séquences d'ADN répétées un beaucoup plus grand nombre de fois dans le génome que les séquences fonctionnelles décrites auparavant. Dans leur ensemble, ces séquences représentent une part importante du génome : on estime qu'environ 20 pour cent du génome humain sont constitués d'ADN répétitif non fonctionnel d'un type ou d'un autre. Nous en examinerons trois classes.

L'ADN centromérique hautement répétitif. Après l'ultracentrifugation de l'ADN génomique dans un gradient de chlorure de césium, il apparaît souvent des bandes satellites, distinctes de la bande d'ADN principale. Cet ADN satellite contient de nombreuses répétitions en tandem de courts motifs de séquence. Ces alignements peuvent s'étendre sur des centaines de kilobases. L'utilisation de sondes correspondant à ces courts motifs de séquence dans des expériences d'hybridation *in situ* montrent que la grande masse de l'ADN satellite se trouve dans les régions hétérochromatiques qui flanquent les centromères. Il y a parfois plusieurs motifs différents dont la longueur dépasse rarement 10 bases. Chez *Drosophila melanogaster*, on trouve des alignements en tandem de la séquence AATAACATAG autour de tous les centromères. Chez le cochon d'Inde, des alignements d'une séquence plus courte CCCTAA flanquent les centromères. Le résultat d'une expérience de marquage *in situ* d'ADN satellite de souris est montré sur la figure 16-27.

L'ADN répétitif centromérique n'est pas représentatif de l'ADN génomique et sa teneur en G+C peut s'écarter considérablement de celle du reste de l'ADN, ce qui explique qu'il forme une bande distincte dans un gradient de densité. Aucune fonction n'a pu être attribuée jusqu'ici à l'ADN répétitif centromérique, pas plus qu'il ne semble y avoir de rapport particulier entre cet ADN et l'hétérochromatine ou certains gènes localisés dans l'hétérochromatine. Certains organismes contiennent des quantités ahurissantes de cet ADN ; par exemple, l'ADN de kangourou est constitué pour moitié d'ADN satellite centromérique.

Les répétitions en tandem en nombre variable (VNTR). Le nombre de ces répétitions en tandem particulières varie selon les loci et selon les individus. Ce sont les **répétitions en tandem en nombre variable** (en anglais, **variable number tandem repeats** ou **VNTR**). Chez l'Homme, les loci contenant les VNTR sont des séquences de 1 à 5 kb contenant un nombre variable de répétitions d'un motif de 15 à 100 nucléotides. Lorsqu'une sonde correspondant à une VNTR est hybridée avec un transfert de type Southern d'ADN génomique total digéré par une enzyme de restriction qui ne coupe pas dans les alignements de cette VNTR, elle révèle un grand nombre de fragments de tailles très différentes. La variation

Figure 16-26. Hybridation in situ des chromosomes avec une sonde spécifique des télomères, couplée à une substance fluorescente jaune. Chaque chromatide soeur fixe la sonde à ses deux extrémités. Un noyau intact est visible dans le bas de la microphotographie. (Robert Moyzis)

Figure 16-27. Localisation d'un court motif de séquence d'ADN de souris au niveau des centromères, par autoradiographie. Une sonde radioactive reprenant le motif de séquence à été incubée avec les chromosomes dont l'ADN avait été dénaturé. (Remarquez que tous les chromosomes de souris sont acrocentriques.) (Tiré de M.L. Pardue et J.G. Gall, *Science*, 168, 1970, 1356.)

du nombre de répétitions en tandem entre individus est telle que ces profils de fragments sont tout à fait caractéristiques d'un individu. En fait, ces profils de bandes sont appelés des **empreintes d'ADN** (figure 16-28). On les utilise de plus en plus systématiquement en médecine légale. Dans une enquête criminelle, des traces de sang ou de sperme suffisent à obtenir une empreinte d'ADN qui peut être comparée à celle d'un suspect. Des quantités infimes d'un tissu, par exemple, quelques cellules du follicule pilo-sébacé qui adhèrent à un cheveu peuvent servir à amplifier les séquences VNTR par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Une des premières sondes permettant de détecter des VNTR humaines fut obtenue par Alec Jeffries en 1985 à partir d'une quadruple répétition d'un motif de 33 pb présente dans le premier

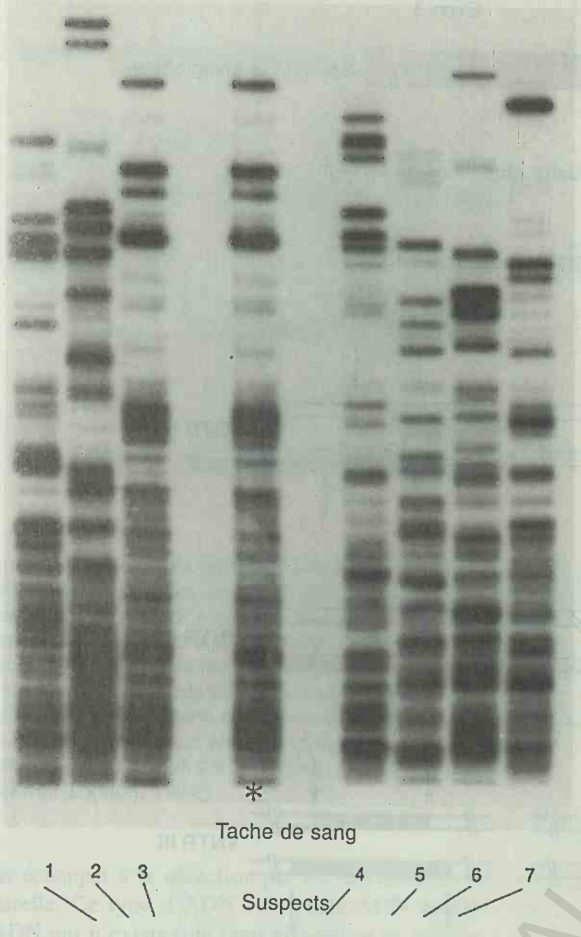


Figure 16-28. Empreintes d'ADN obtenues à partir d'une tache de sang trouvée sur les lieux d'un crime et à partir du sang de septs suspects. (Cellmark Diagnostics, Germantown, MD)

intron du gène de la myoglobine (figure 16-29a). Après clonage et séquençage de quelques unes des VNTR identifiées dans l'empreinte d'ADN, il est apparu que la séquence qui s'hybride effectivement est un motif de 13 paires de bases commun à la sonde et à toutes les VNTR. Les séquences plus longues dans lesquelles ce motif est inséré ne sont pas nécessairement conservées.

On trouve des VNTR chez de nombreuses espèces et l'utilisation des empreintes génétiques pour tester l'individualité génétique peut donc être généralisée.

Une autre classe d'ADN répétitif dispersé est constituée de répétitions de dinucléotides. Cette classe est appelée **ADN microsatellite**. Bien qu'on ne l'inclue pas dans les VNTR, l'ADN microsatellite contient aussi un nombre variable de répétitions en tandem dispersées dans le génome. Comme le nombre de répétitions varie selon les individus, ce type d'ADN fournit de nombreux marqueurs moléculaires pour la cartographie d'immenses distances dans le génome humain. Nous en reparlerons dans le chapitre 17.

Les séquences transposées. Dans le chapitre 21, nous parlerons d'une classe particulière d'éléments génétiques qui sont capables de se déplacer dans le génome. Ces éléments sont appelés des **éléments génétiques mobiles** ou parfois **transposons***. Les séquences transposées occupent une part importante du génome humain et d'autres génomes eucaryotiques. Un premier type d'éléments de cette classe sont les vrais transposons qui se déplacent sous forme de segments d'ADN. Dans le chapitre 21, nous en présenterons quelques exemples tels que les transposons Ac/Ds du maïs et les éléments P de la drosophile. De nombreux génomes contiennent plusieurs copies dispersées, parfois tronquées, de ce type d'éléments.

Un second type d'éléments transposés répétés est constitué par les **rétrotransposons**. Il s'agit de séquences qui se sont répandues dans le génome après transcription inverse d'ARN et qui sont apparentées aux rétrovirus. Nous avons déjà parlé de l'enzyme transcriptase inverse qui fait une copie ADN de l'ARN. Ces copies s'intègrent ensuite en différents sites du génome. Comme exemples d'éléments transposables apparentés aux rétrovirus, citons les éléments copia de la Drosophile (des séquences de 5 kb présentes à raison d'environ 50 copies par génome), les éléments Ty de la levure (des éléments de 6 kb, au nombre d'environ 30 copies complètes par génome, auxquelles s'ajoutent quelque 100 copies «en solo» de leurs répétitions terminales directes, appelées séquences delta), et les **LINEs** (de l'anglais Long INterspersed Elements) des mammifères (des éléments de 1 à 5 kb, présents en 20000 à 40000 exemplaires dans le génome humain). La figure 16-30 présente la structure générale de plusieurs rétrotransposons.

La séquence *Alu* humaine, ainsi appelée parce qu'elle contient souvent un site de coupure par l'enzyme de restriction *Alu*, fait partie d'une classe de rétrotransposons qui ne sont pas apparentés aux rétrovirus. Le génome humain contient des centaines de milliers de séquences *Alu*, complètes ou tronquées, dispersées entre les gènes et même dans les introns et elles constituent environ 5 pour cent de l'ADN humain. La séquence *Alu* complète est longue de 200 pb et elle présente une ressemblance remarquable avec l'ARN 7SL, un ARN qui fait partie d'un complexe impliqué dans la sécrétion des polypeptides nouvellement synthétisés au travers du réticulum endoplasmique. Les séquences *Alu* proviennent vraisemblablement de transcrits inverses de ces molécules d'ARN. De courtes séquences répétées dispersées telles que les séquences *Alu* sont appelées des **SINEs** (de l'anglais Short INterspersed Elements).

D'autres exemples de cette classe d'éléments moyennement répétitifs sont les nombreux pseudogènes dispersés qui ont manifestement été produits par transcription inverse parce qu'ils ne contiennent plus les introns du gène fonctionnel original.

L'ADN espaceur

La dernière classe d'ADN est l'ADN espaceur. Il s'agit simplement de ce qui reste après que toutes les catégories précédentes aient été identifiées. Il va sans dire que l'on sait peu de choses de cet ADN. Sa seule fonction est peut-être simplement d'espacer.

Message Les gènes présents en un seul exemplaire sont insérés dans un arrangement complexe de séquences d'ADN répétitif en tandem ou dispersé dont la plupart n'ont aucune fonction connue.

**N. d. T. L'appellation transposon est en fait restrictive. Les transposons sont une classe particulière d'éléments génétiques mobiles, comme nous le verrons par la suite.*

BIBLIOTECA CENTRAL UNIVERSIDAD

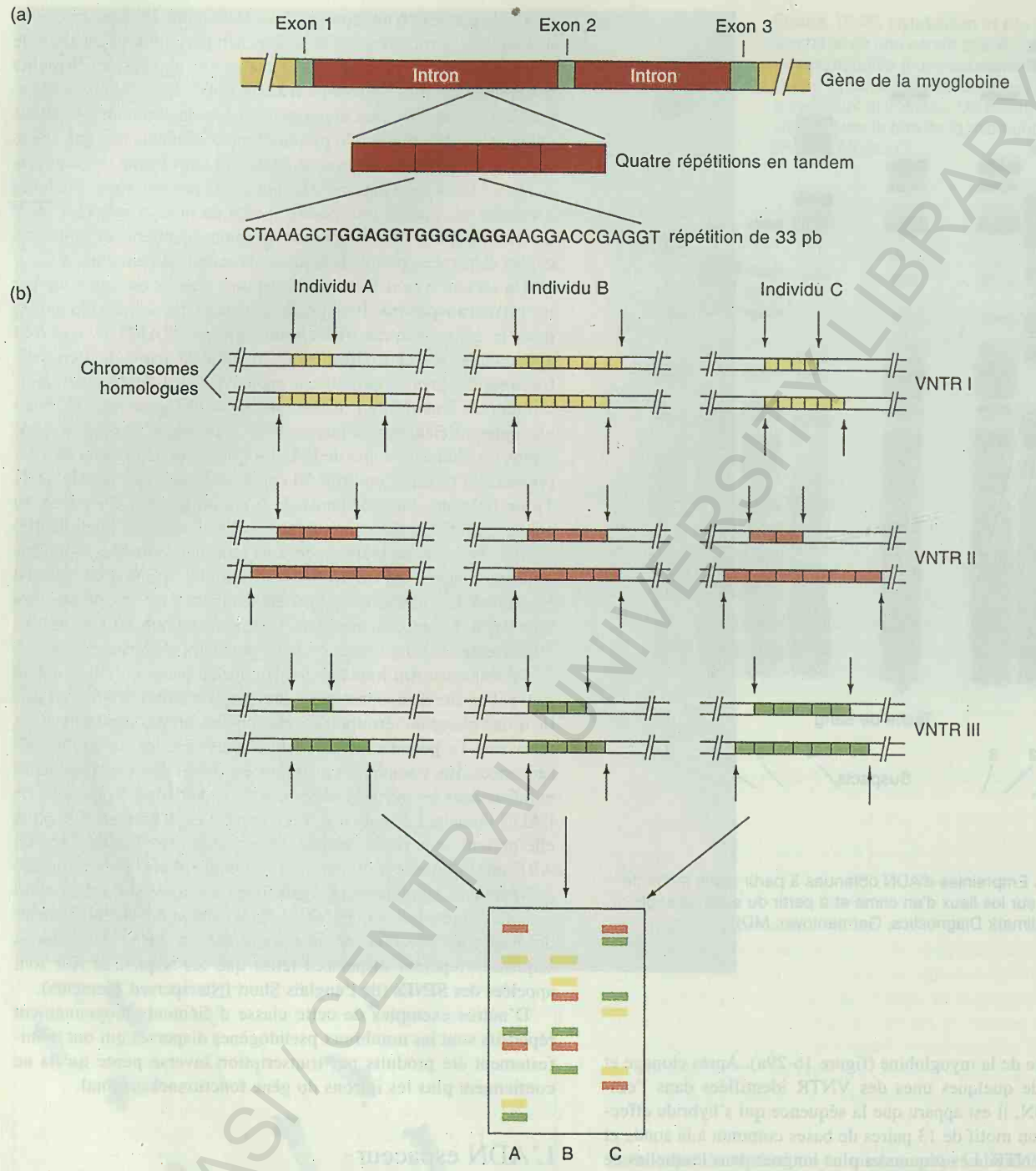


Figure 16-29. Obtention d'une empreinte d'ADN avec une sonde VNTR. (a) Préparation de la sonde. Le premier intron du gène de la myoglobine contient quatre répétitions de la séquence de 33 pb représentée ici, dans laquelle on distingue une séquence coeur de 13 pb. On retrouve cette séquence coeur à d'autre loci VNTR qui ont été désignés respectivement VNTRI, II et III dans la représentation simplifiée que voici. (b) Le nombre de répétitions aux trois loci VNTR qui contiennent la séquence coeur chez les individus A, B et C. En sondant un transfert de type Southern avec la séquence de 33 pb décrite en (a), on obtient les empreintes d'ADN des trois individus. (Tiré de J.D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2è éd., © 1992, Scientific American Books.)

L'existence d'ADN sans fonction identifiable constitue une énigme pour les généticiens. Le concept bien établi d'une sélection naturelle très puissante impliquait que tout ADN non fonctionnel serait éliminé par cette sélection, ne serait-ce que parce que sa réplication constituerait un fardeau énergétique pour l'organisme qui le contient. Cette notion semble à présent contredite dans la réalité. Peut-être cet ADN n'est-il non fonctionnel qu'en apparence et sert-il de «ballast génétique» en donnant aux chromosomes la masse critique requise pour une ségrégation efficace à la division cellulaire. Peut-être encore sert-il à séparer les régions d'ADN fonctionnel (les gènes) pour renforcer l'efficacité de la régulation de leur expression. Une autre explication serait que les éléments répétés qui constituent la majeure partie de l'ADN sans fonction connue ont «découvert» une stratégie

BCU LAUSANNE / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

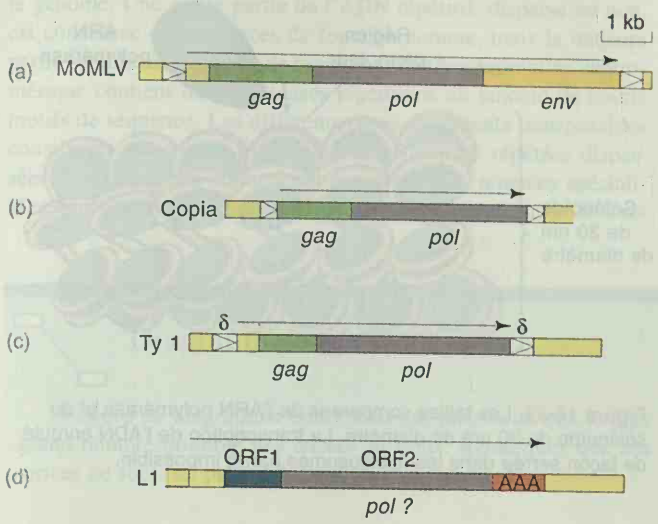


Figure 16-30. Structure générale de quelques rétroéléments présents dans les génomes eucaryotiques. *Gag*, *pol* et *env* sont des gènes rétroviraux. ORF = cadre ouvert de lecture (Open Reading Frame en anglais). Les triangles blancs indiquent les répétitions directes terminales. Les flèches indiquent le sens de la transcription. (a) Un rétrovirus, le virus de la leucémie murine de Moloney. (b) Copia, un rétrotransposon de la drosophile. (c) Ty, un rétrotransposon de levure. (d) L1, un élément LINE humain. (D'après J.R.S. Fincham, *Genetic Analysis : Principles, Scope and Objectives*. Blackwell, London, 1994.)

pour échapper à la détection par les mécanismes de la sélection naturelle. Ce type d'ADN est appelé **ADN égoïste**, une classe d'ADN qui n'existe que pour elle-même et qui n'est pas passée au crible de l'expression phénotypique.

La représentation de l'organisation générale d'un chromosome hypothétique, donnée dans la figure 16-31, résume la discussion qui a précédé. Cependant, nous pouvons à présent étudier l'architecture d'un vrai chromosome eucaryotique puisque le génome de levure a été entièrement séquencé. L'organisation des gènes et des autres éléments sur un de ces chromosomes (le numéro 3) est montrée sur la figure 17-19. Le chromosome contient 315 kb. L'analyse de la séquence a révélé l'existence de 182 cadres ouverts de lecture (indiqués en bleu foncé). 34 seulement de ces 182 gènes pouvant coder pour des protéines avaient été découverts par les techniques de la génétique classique et ils sont représentés en jaune. On tente à présent d'identifier les fonctions qui pourraient être codées par les cadres ouverts de lecture restants en les comparant avec les séquences d'ADN contenues dans des banques de données et en examinant les phénotypes mutants qui résultent de leur interruption. Les séquences delta sont les répétitions terminales en solo mentionnées précédemment qui restent après l'excision de rétrotransposons Ty. Remarquez que la levure ne contient pratiquement pas d'ADN répétitif dispersé, de sorte que les gènes sont relativement proches les uns des autres, séparés par de courtes séquences d'ADN espaceur.

La réplication et la transcription de la chromatine

Nous avons vu que l'armature centrale du chromosome contient de la topoisomérase II qui doit sûrement jouer un rôle dans la réplication, mais la façon dont les polymérases et les facteurs qui leur sont associés accèdent au centre de la chromatine reste une énigme. Bien d'autres questions restent encore sans réponse. Une question importante est de comprendre comment la machinerie de réplication franchit l'obstacle constitué par le nucléosome. Les histones ne semblent pas se détacher de l'ADN pendant ce processus, mais le nucléosome pourrait se dissocier partiellement in situ. Il y a toujours une controverse quant à la répartition des nucléosomes «anciens» et des «nouveaux» entre les molécules d'ADN répliquées, mais tout bien considéré, la plupart des données expérimentales favorisent un modèle dispersif dans lequel chaque molécule fille est associée à la fois à des nucléosomes anciens et à des nouveaux (figure 16-32).

Un problème analogue se pose pour la transcription. L'ARN polymérase a approximativement le même diamètre que la structure en solénoïde de la chromatine (figure 16-33). Il semble dès lors peu vraisemblable que l'enzyme puisse fonctionner sans un relâchement concomitant du complexe ADN/histones. En fait, il y a des indications que lorqu'un gène est transcrit pendant l'interphase, il devient sensible à la désoxyribonucléase comme on s'y attendrait si les bobines de nucléosomes se relâchaient en exposant du même coup de l'ADN désenroulé. Ce phénomène peut être mis en évidence dans des cellules de poulet qui synthétisent des globines. Si les noyaux de ces cellules sont exposés à la DNase, l'analyse par restriction de leur ADN, après élimination des histones, ne permet d'identifier aucun gène de globine intact. Par contre, la même expérience produit des fragments caractéristiques des gènes de globines à partir de cellules où ces gènes n'étaient pas exprimés. Une configuration possible d'un nucléosome relâché est présentée sur la figure 16-34.

Message Dans la chromatine, la réplication et la transcription s'effectuent sans que les nucléosomes disparaissent.

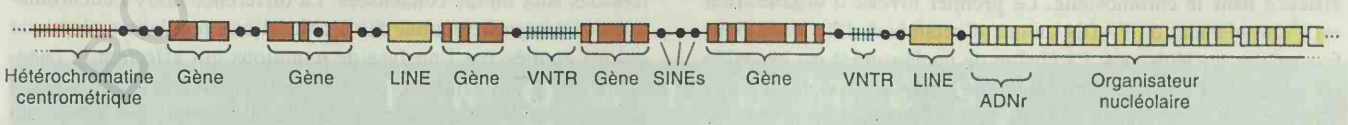


Figure 16-31. Aspect général d'un chromosome eucaryotique. La courte région de chromosome représentée ici contient cinq gènes qui codent pour des protéines, une extrémité d'organisateur nucléolaire et une extrémité d'un bloc d'hétérochromatine centromérique. Plusieurs types d'ADN répétitif sont aussi présents. (Un véritable chromosome contient normalement plusieurs milliers de gènes.)

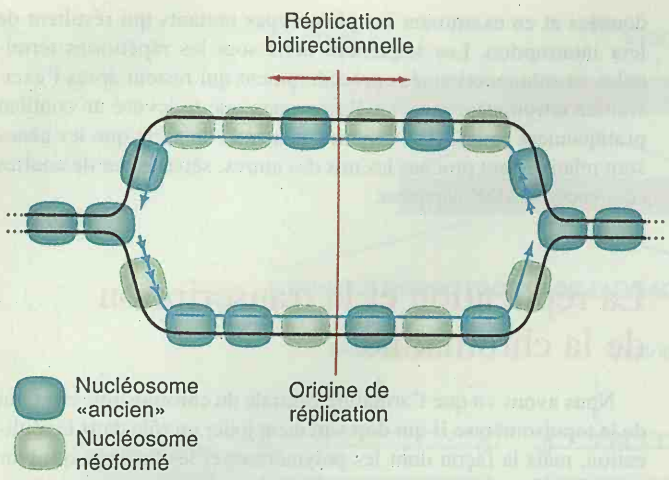


Figure 16-32. Modèle dispersif de l'association des nucléosomes nouvellement formés avec les molécules filles d'ADN au niveau de la fourche de réplication.

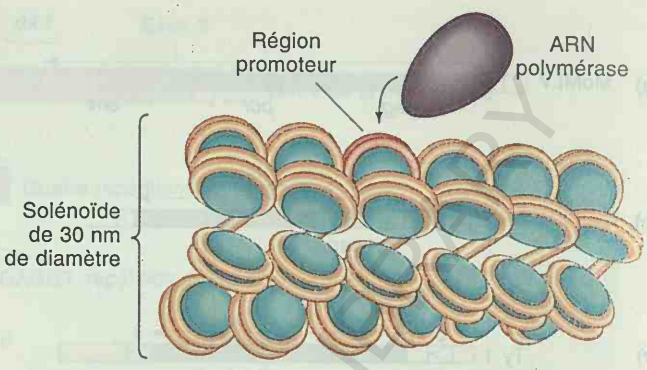


Figure 16-33. Les tailles comparées de l'ARN polymérase et du solénoïde de 30 nm de diamètre. La transcription de l'ADN enroulé de façon serrée dans les nucléosomes paraît impossible.

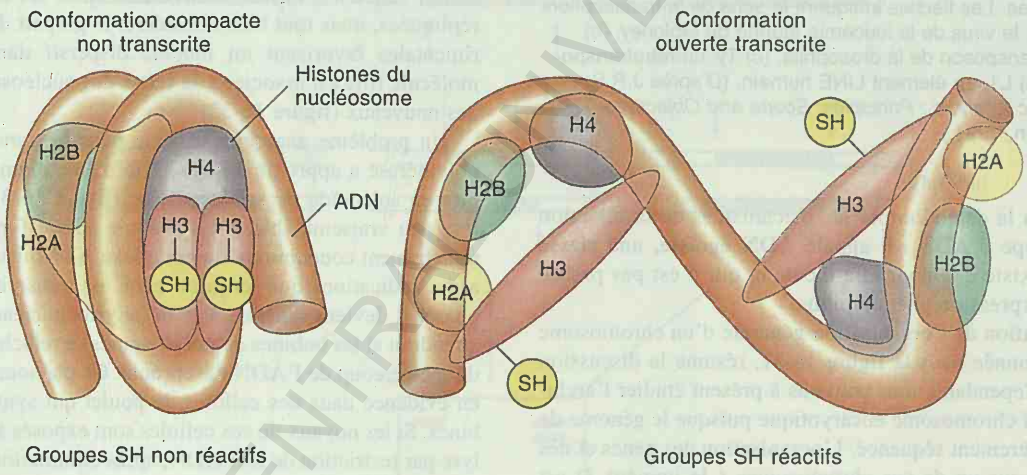


Figure 16-34. Forme compacte d'un nucléosome et forme relâchée hypothétique permettant la transcription. (D'après C.P. Pryor et al., *Cell*, 34, 1983, 1033.)

RÉSUMÉ

Chaque chromosome eucaryotique contient une seule molécule d'ADN qui s'étend sans interruption d'une extrémité à l'autre en passant par le centromère. Cet ADN est compacté de façon très efficace dans le chromosome. Le premier niveau d'organisation est l'enroulement de l'ADN autour d'octamères d'histones pour former des nucléosomes. La chaîne de nucléosomes est enroulée en solénoïde. La structure en solénoïde forme des boucles à partir d'une armature centrale à laquelle elle est attachée au niveau de régions spécifiques. La structure tout entière est elle-même arrangée en grandes torsades. La condensation de ces torsades à la métaphase facilite la ségrégation des chromosomes et permet d'observer des profils de bandes quand on les colore avec le réactif de Giemsa. Les bandes claires contiennent les gènes de maintenance et les bandes foncées contiennent les gènes qui ne s'expriment que dans des tissus spécifiques. Pendant l'interphase, les torsades sont moins condensées. La différence entre l'euchromatine et l'hétérochromatine fait l'objet d'une régulation génétique qui est étudiée par l'analyse de mutations qui affectent la panachure due à des effets de position. Les centromères contiennent des structures spécialisées pour l'attachement des fibres du fuseau.

Les chromosomes eucaryotiques contiennent beaucoup d'ADN répétitif. Une partie de cet ADN répétitif se présente sous la forme d'alignements en tandem. Une autre partie est dispersée dans tout

le génome. Une petite partie de l'ADN répétitif, dispersé ou non, est constituée de séquences de fonction connue, mais la majeure partie semble ne pas avoir de fonction. L'hétérochromatine centromérique contient de nombreuses répétitions en tandem de courts motifs de séquence. Les différents types d'éléments transposables constituent une classe importante de séquences répétées dispersées. Les télomères contiennent des séquences répétées spécialisées qui forment des structures permettant à la réplication de s'effectuer jusqu'aux extrémités des chromosomes.

La réplication et la transcription peuvent s'effectuer en présence des nucléosomes, mais l'enroulement de l'ADN dans les nucléosomes est en partie relâché et les histones pourraient subir une dissociation limitée au cours de ces deux processus. La réplication des nucléosomes s'effectue selon un mode dispersif : chacune des deux molécules filles d'ADN est associée avec des nucléosomes anciens et nouvellement formés.

Diagramme conceptuel

Dessinez un diagramme conceptuel qui relie entre eux le plus grand nombre possible des termes suivants. Remarquez que ces termes ne sont pas présentés dans un ordre particulier.

histones / chromosome / transcription / panachure liée à des effets de position / ADN / nucléosomes / bandes / boucles / armature centrale / hétérochromatine

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Une souche de Drosophile au corps de couleur jaune (*yy*) est transformée par un vecteur porteur de l'allèle sauvage y^+ fonctionnel qui spécifie la couleur brune du corps. Deux lignées transgéniques sont produites dont une a le corps brun uni et l'autre présente une panachure de secteurs bruns et de secteurs jaunes. Donnez une explication possible de la différence entre ces deux lignées de mouches transgéniques et proposez une méthode pour tester votre hypothèse.

Solution

L'allèle *y* doit être récessif, sinon aucun des individus transformés n'aurait le corps brun (chapitre 2). Par conséquent, on s'attend à ce que les mouches transgéniques qui contiennent vraisemblablement deux allèles *y* et un allèle y^+ soient brunes si y^+ est complètement dominant en présence de deux allèles *y* récessifs. Nous avons vu dans le chapitre 9 que ce type de dominance est fréquent chez les aneuploïdes et il est observé en effet dans une des lignées construites dans l'expérience L'autre lignée présente une panachure, ce qui nous renseigne sur la localisation du transgène. En effet, une panachure liée à des effets de position pourrait résulter de l'intégration du transgène dans un chromosome, près d'une zone d'hétérochromatine. Aucun autre mécanisme susceptible de produire une panachure (par exemple, un crossing-over somatique ou l'inactivation d'un chromosome X) n'est vraisemblable dans le cas qui nous occupe. Le transgène peut être localisé dans les deux lignées en effectuant une analyse de liaison classique comme cela a été expliqué au chapitre 5. Nous pouvons prédire que le transgène occupera un locus proche de l'hétérochromatine dans la lignée jaune et brune et qu'il sera localisé dans l'euchromatine, peut-être au locus jaune normal mais plus probablement à un nouveau locus, dans l'autre lignée.

PROBLÈME RÉSOLU

Des chercheurs ont observé que les mutations *E(var)* chez *Drosophila* sont moins fréquentes que les mutations *Su(var)*. A votre avis, pourquoi ?

Solution

Nous avons appris dans ce chapitre que les mutations *E(var)* renforcent la panachure liée à des effets de position en augmentant l'étendue de l'hétérochromatine. Nous pouvons donc supposer que les régions euchromatiques adjacente à l'hétérochromatine contiennent des gènes essentiels qui se trouveraient hétérochromatisés dans un nombre cellules tellement important chez les mouches *E(var)* que des fonctions vitales seraient perdues. Ces mouches ne seraient pas viables.

PROBLÈMES

1. Deux hommes se disputent la paternité d'un enfant. Les généticiens d'un Institut de Médecine légale utilisent les empreintes d'ADN pour régler le différend. Les résultats sont présentés ci-dessous (M, la mère ; C, l'enfant ; F1 et F2, les deux hommes qui revendiquent la paternité).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a. Qui est le père ? Expliquez.

b. Attribuez autant de bandes que possible à chacun des parents.

c. Y a-t-il des bandes qui ne peuvent être attribuées à l'un des parents ?

d. Si l'enfant présentait une bande qu'aucun parent ne possède, comment l'expliqueriez-vous ? (Cela arrive parfois.)

e. Expliquez ce qu'une bande représente en vous servant d'un schéma.

(Empreinte d'ADN fournie par Cellmark Diagnostics, Germantown, MD)

2. Supposez qu'un allèle sauvage essentiel de *Drosophila* soit amené par translocation près d'un bloc d'hétérochromatine sur un des homologues et que l'autre homologue porte le gène au site chromosomique normal, mais que cet allèle est récessif létal. Quel sera le phénotype de la mouche chez **(a)** un mutant *Su(var)*, **(b)** un mutant *E (var)*, **(c)** une mouche sauvage pour ces marqueurs ? Faites d'abord l'hypothèse que le produit du gène essentiel est diffusible dans tout le corps, ensuite faites l'hypothèse inverse, c'est-à-dire qu'il n'est utilisé que dans les cellules où il est synthétisé.

3. Prédisez les profils d'hybridation in situ obtenus pour les chromosomes humains avec les sondes suivantes :

a. un gène présent en un seul exemplaire

b. un fragment de séquence télomérique

c. de l'ADNr

d. un élément de type SINE

e. de l'ADN satellite

4. Supposez qu'on trouve une séquence de type SINE toutes les 50 kb en moyenne et que vous coupez l'ADN avec une enzyme qui coupe en moyenne toutes les 100 kb. Vous dénaturez l'ADN thermiquement, puis vous le refroidissez lentement pour favoriser la réassociation des brins. Prédisez ce que vous verriez au microscope électronique.

5. Des généticiens ont préparé des empreintes d'ADN à partir du sang d'une femme violée, à partir de sperme prélevé sur elle et à partir d'échantillons prélevés sur trois suspects. Les transferts Southern obtenus sont montrés ci-dessous

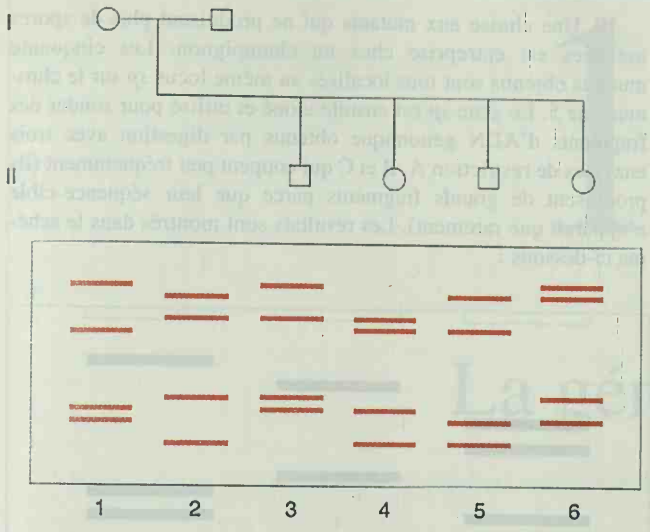
a. Un des suspects est-il clairement identifiable comme le coupable ?

b. Des suspects peuvent-ils être innocentés ? Expliquez vos réponses.

(Empreintes d'ADN fournies par Cellmark Diagnostics, Germantown, MD)

6. Une sonde VNTR révèle les profils suivants sur les empreintes d'ADN de la famille décrite ci-dessous.

BIOLOGICAL CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Sur la base de ces résultats, que pouvez-vous dire du nombre de loci VNTR, de leur liaison et du nombre et de la taille des allèles ?

7. Les gènes responsables de la couleur de l'oeil (*w* = blanc, + = rouge) et de la texture de l'oeil (*r* = rugueux, + = lisse) sont situés à l'extrémité du chromosome X chez *Drosophila*. Des inversions affectant le chromosome X sont croisées individuellement avec des chromosomes X normaux porteurs des allèles récessifs *w* et *r*. Les génotypes obtenus sont (chez les femelles) Normal *w r* / Inversion + +. Les résultats de l'examen des yeux de ces femelles sont présentés dans le tableau ci-dessous.

	Pourcentage des facettes de l'oeil qui sont		
	blanches	rugueuses	blanches et rugueuses
1 (w^+ r^+)	50	0	10
2 (w^+ r^+)	10	0	2
3 (w^+ r^+)	0	30	0
4 (w^+ r^+)	12	0	4

NOTE : ( ) = points de rupture des inversions.

a. Expliquez les différences de fréquences obtenues pour les différentes inversions.

b. Pourquoi les valeurs zéro observées pour les inversions 3 et 4 s'expliquent-elles différemment ?

c. Quelles fréquences prédiriez-vous (dans les trois colonnes) dans le cas d'une femelle de génotype Inversion 1 + + / Inversion 2 + + ?

8. Les transposons peuvent être utilisés comme mutagènes. Ils inactivent les gènes en s'y insérant ou en s'insérant dans des sites proches. Dans une expérience réalisée sur la levure, des copies d'un transposon sont introduites dans des cellules haploïdes qui n'en contenaient pas jusque là. On permet à des copies du transposon de s'intégrer de façon aléatoire dans tout le génome, puis on examine le phénotype des souches produites. 70 pour cent des souches ont un phénotype mutant qui peut être attribué à l'insertion du transposon. 30 pour cent sont apparemment de type sauvage.

a. Comment s'assurer que les souches de phénotype sauvage contiennent quand-même un transposon ?

b. Comment vérifier que les phénotypes mutants sont bien produits par l'insertion du transposon ?

c. Comment expliquer les 30 pour cent qui ne sont pas affectés dans leur phénotype ?

9. Une femelle de *Drosophila* est hétérozygote pour une translocation réciproque entre le chromosome X et le chromosome 3. Ses yeux ont la couleur sauvage (rouge). Elle fut croisée avec un mâle de descendance mixte dont les yeux sont de couleur blanche. La descendance femelle du croisement se présentait comme suit :

1/2 yeux rouges

1/4 panachure des yeux avec 60% de facettes blanches

1/4 panachure des yeux avec 20% de facettes blanches

Quand les femelles à 20% de facettes blanches furent croisées avec leur père, une partie de leur descendance femelle présentait une panachure des yeux avec seulement 2% de facettes blanches. Faites une hypothèse pour expliquer l'apparition de femelles avec

a. 60% de facettes blanches.

b. 20% de facettes blanches.

c. 2% de facettes blanches.

d. Expliquez les proportions des deux premiers types de descendants du croisement initial.

Décomposons le problème

a. Définissez les termes *panachure*, *facette*, *translocation réciproque*, *type sauvage*, *hétérozygote*.

b. Que signifie l'expression «de descendance mixte» ?

c. Composez une phrase qui reprenne les mots *panachure*, *translocation*, *facette* et *type sauvage*.

d. Résumez ce que vous savez de la position du gène responsable des yeux blancs chez *Drosophila*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

e. Quelle est la composition en chromosomes X des drosophiles mâles et femelles ?

f. Quel doit être le génotype de la couleur des yeux du parent mâle ?

g. Quel doit être le génotype de la couleur des yeux du parent femelle ?

h. Dans un croisement entre parents des génotypes décrits en f et g, quelle sera la proportion de chaque sexe dans la descendance ?

i. Donnez trois causes possibles de panachure et indiquez celle qui est probablement d'application dans ce problème.

j. L'implication du chromosome 3 dans la translocation est-elle pertinente à cette question ?

k. Quelle explication donnez-vous du rapport 1 :1 entre yeux rouges et yeux à panachure dans la descendance femelle ?

l. Quelle explication donnez-vous du rapport 1 :1 entre la descendance à 60% et à 20% de facettes blanches ?

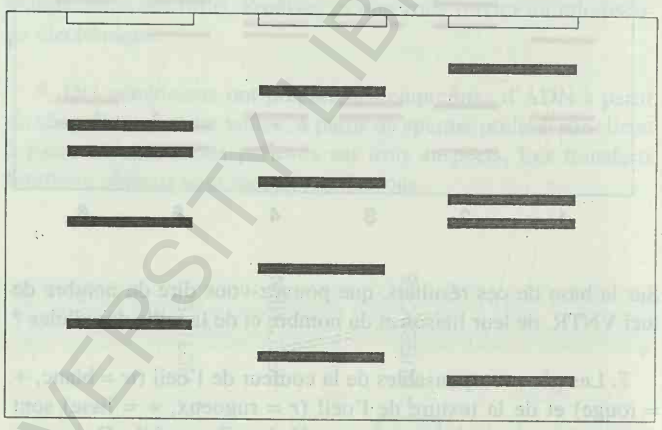
m. Chez une mouche avec 60% de facettes blanches, quelle est le phénotype des 40 autres pour cent des facettes ?

n. Il y a trois classes de panachure de l'oeil : fréquence de facettes blanches élevée, intermédiaire et faible. Quelle combinaison mendélienne d'allèles peut-elle expliquer l'existence de ces trois classes distinctes ?

o. Est-il significatif que les femelles avec la fréquence de facettes blanches la plus faible produisent une descendance avec une fréquence de facettes blanches encore plus faible quand elles sont croisées avec leur père ?

p. Quel est la contribution du père à la fréquence de facettes blanches dans la descendance femelle ?

10. Une chasse aux mutants qui ne produisent plus de spores asexuées est entreprise chez un champignon. Les cinquante mutants obtenus sont tous localisés au même locus *sp* sur le chromosome 5. Le gène *sp* est ensuite cloné et utilisé pour sonder des fragments d'ADN génomique obtenus par digestion avec trois enzymes de restriction A, B et C qui coupent peu fréquemment (ils produisent de grands fragments parce que leur séquence-cible n'apparaît que rarement). Les résultats sont montrés dans le schéma ci-dessous :



a. Expliquez pourquoi la sonde s'hybride avec plusieurs fragments.

b. Pourquoi la sonde s'hybride-t-elle avec quatre fragments dans chaque cas ?

c. Pensez-vous que les enzymes coupent l'ADN à l'intérieur du gène *sp* ?

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

17

La génomique

Porcs impliqués dans le projet international de cartographie du génome du porc «PiGMaP». Deux souches parentales pures, Large White et Meisham, diffèrent par de nombreux marqueurs moléculaires et morphologiques. Ces lignées sont croisées et les hybrides F_1 sont croisés à leur tour pour obtenir une génération F_2. A la F_2, les différents profils d'assortiment des marqueurs sont utilisés pour déterminer les liaisons et cartographier le génome. Sur la photographie, la truie allongée est un hybride F_1 tandis que les porcelets de diverses couleurs qui tètent le lait appartiennent à la génération F_2. (Reproduit avec l'aimable permission du Roslin Institute, Edinburgh.)

CONCEPTS-CLÉS

- La génomique a pour objet la caractérisation moléculaire des génomes entiers.
- L'analyse génomique débute par l'utilisation de diverses techniques pour assigner les gènes à des chromosomes spécifiques.
- La seconde étape de l'analyse est une cartographie chromosomique à faible résolution basée principalement sur une analyse par recombinaison méiotique. Dans le cas particulier de l'homme, des cellules hybrides spéciales peuvent également être utilisées.
- La variation neutre de l'ADN a fourni de nombreux marqueurs moléculaires hétérozygotes utiles pour l'analyse fine par recombinaison.
- Le plus haut niveau de résolution en analyse cartographique génomique est atteint par la cartographie physique de fragments d'ADN clonés.
- L'arrangement des fragments d'ADN clonés en séries de clones chevauchants est facilité par des techniques moléculaires spéciales qui permettent d'identifier les clones au moyen de séquences marqueurs.
- Finalement, des séquences de chromosomes et de génomes entiers sont obtenues en séquençant les membres des séries de clones chevauchants.
- La génomique fournit l'information de base nécessaire à l'isolement de gènes spécifiques intéressants, y compris de gènes impliqués dans des maladies héréditaires humaines.

BCU IASI / UNIVERSITY LIBRARY

La génomique est une sous-discipline de la génétique qui concerne le clonage et la caractérisation moléculaire des génomes entiers. L'objectif général de la génétique est de comprendre la structure, la fonction et l'évolution des génomes et, en effet, toutes les analyses décrites dans cet ouvrage sont centrées sur cet objectif. Puisque la génomique, le sujet de ce chapitre, s'inscrit précisément parmi ces objectifs, pourquoi mérite-elle une attention particulière ? C'est que, bien qu'il existe un chevauchement et une complémentarité appréciables entre les méthodologies analytiques utilisées dans cette discipline et en génétique, des techniques analytiques spéciales ont été développées en vue de manipuler des génomes entiers contenant des quantités énormes d'ADN. Ces techniques spéciales sont au centre de ce chapitre.

Des projets de séquençage de génomes sont actuellement en cours pour un large éventail d'organismes différents y compris l'Homme («le projet de séquençage du génome humain»), la souris, *Drosophila*, la levure, *Caenorhabditis elegans* (un nématode), *Arabidopsis thaliana* (une plante) et plusieurs bactéries. Les génomes de plusieurs virus et d'au moins deux bactéries ont été entièrement séquencés ainsi que tous les chromosomes de la levure. Plusieurs génomes mitochondriaux et chloroplastiques ont également été séquencés dans leur totalité. En raison de l'ampleur de la tâche, beaucoup de ces projets ont été entrepris par des groupes internationaux impliquant des centaines de généticiens qui collaborent et échangent les données obtenues pour les différentes régions des génomes étudiés. Souvent des groupes ou même des nations se spécialisent dans l'analyse de certains chromosomes spécifiques. Il est clair que les biologistes sont d'accord sur l'importance de ce type de recherche et il vaut la peine de se demander pourquoi il en est ainsi avant d'examiner en détail les techniques impliquées.

Premièrement, l'obtention d'un jeu de clones ordonnés couvrant la totalité d'un chromosome ou d'un génome est un atout incomparable pour la poursuite des études moléculaires. Ces clones serviront à identifier et à manipuler des gènes individuels et seront le point de départ du séquençage du génome. L'ADN d'un génome est le plan qui contient toute l'information nécessaire pour la construction d'une cellule ou d'un organisme vivant. La connaissance de sa séquence nucléotidique spécifique fournira une réponse à une des questions fondamentales de la biologie : Pourquoi un organisme est-il ce qu'il est et pourquoi est-il différent des autres organismes ? Certes, le seul fait de connaître la séquence entière d'un génome ne peut répondre à toutes les questions mais c'est le point de départ de nouvelles expérimentations qui viseront à comprendre les fonctions des gènes individuels et des régions non codantes ainsi que la manière dont ils interagissent.

Si on possède énormément d'informations quant à la structure et à la fonction des gènes individuels, on sait peu de chose des principes qui régissent l'organisation des régions fonctionnelles et non fonctionnelles dans les génomes entiers. Cette question se pose à un autre niveau et ne peut trouver de réponse que dans la détermination des séquences entières. Une partie de la question concerne manifestement l'évolution : Comment les génomes furent-ils assemblés au cours de celle-ci ? La localisation précise des gènes sur les chromosomes est-elle sans importance ou doivent-ils se trouver à un endroit spécifique pour assurer un fonction adéquate ? On sait que la position des gènes est conservée chez des espèces apparentées (figure 8-38) mais on ignore la signification de cette observation. D'autres questions qui se posent sont celles du nombre et des types de gènes nécessaires pour définir une espèce donnée et comment ce nombre et ces types varient d'un taxon à un autre. Il existe incontestablement bien d'autres relations au niveau de la structure et de la fonction des génomes qui ne peuvent être appréciées sans une connaissance approfondie de plusieurs organismes.

Enfin, le projet de séquençage du génome humain présente une signification particulière pour nous, humains, par la perception de la nature de l'homme qu'il promet autant que par les applications médicales qu'il annonce. Bien que des progrès rapides soient enregistrés dans le clonage et la caractérisation des gènes des maladies humaines, il reste beaucoup à faire. On estime, par exemple que moins de 5 pour cent des gènes humains exprimés phénotypiquement ont été localisés et que parmi ceux-ci une faible proportion seulement a été caractérisée au niveau moléculaire.

Message La caractérisation des génomes entiers est importante pour comprendre les principes de base de la construction des organismes vivants et pour la recherche de nouveaux gènes comme ceux qui sont impliqués dans les maladies héréditaires de l'homme.

L'analyse génomique comporte en général plusieurs étapes dont le pouvoir de résolution va en croissant :

1. L'assignation des gènes et marqueurs moléculaires à des chromosomes spécifiques.
2. Le calcul des distances qui séparent les loci sur les chromosomes.
3. La localisation physique de fragments d'ADN individuels (clonés ou non clonés).

Ces techniques génomiques sont utiles non seulement pour établir des cartes chromosomiques générales mais aussi pour déterminer la localisation d'un gène sur une carte existante, en vue de son isolement. Ces démarches sont résumées dans la figure 17-1.

L'assignation des loci à des chromosomes spécifiques

Plusieurs méthodes différentes sont utilisées pour assigner des gènes ou des marqueurs à des chromosomes individuels. Certaines ont été décrites dans d'autres parties de cet ouvrage et sont reprises ici par souci d'être complet. D'autres techniques sont présentées ici pour la première fois.

La liaison aux loci connus

Chez les organismes bien étudiés, il est facile de croiser une souche porteuse d'un allèle nouveau non cartographié avec une série de souches possèdant des marqueurs disséminés dans tout le génome et dont on connaît les localisations chromosomiques. Des fréquences de recombinaison méiotique inférieures à 50 pour cent indiquent une liaison et assignent dès lors le nouvel allèle à un

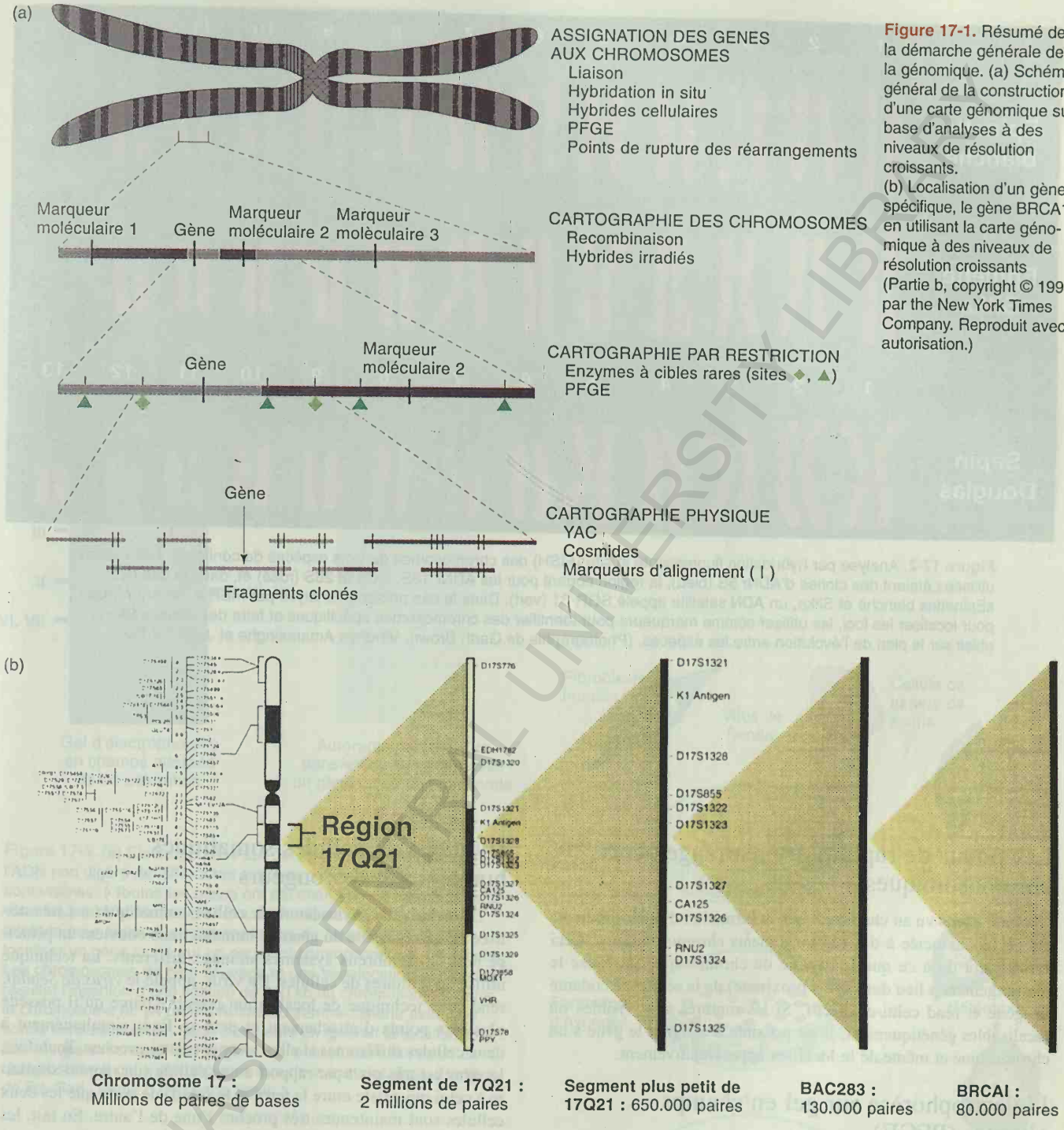


Figure 17-1. Résumé de la démarche générale de la génomique. (a) Schéma général de la construction d'une carte génomique sur base d'analyses à des niveaux de résolution croissants. (b) Localisation d'un gène spécifique, le gène BRCA1, en utilisant la carte génomique à des niveaux de résolution croissants (Partie b, copyright © 1994 par the New York Times Company. Reproduit avec autorisation.)

chromosome particulier. De telles données permettent souvent une localisation grossière sur le chromosome, par exemple sur un des bras ou même sur une bande du chromosome.

L'hybridation in situ

Lorsqu'un gène cloné est disponible, il peut servir à préparer une sonde marquée destinée à l'hybridation in situ. Si les chromosomes individuels sont reconnaissables par leurs profils de bandes, leurs tailles, leurs rapports de longueur de bras ou par d'autres caractéristiques cytologiques, le nouveau gène pourra être assigné à un chromosome. La localisation de l'hybridation fournit également une estimation grossière de la position sur le chromosome.

Les marquages de sondes les plus couramment utilisés sont la radioactivité et la fluorescence. Dans le processus d'**hybridation fluorescente in situ** (**FISH** pour «fluorescent in situ hybridization» en anglais), le clone est marqué au moyen d'un colorant fluorescent et une préparation chromosomique partiellement dénaturée est plongée dans une solution de sonde. La sonde se lie in situ au chromosome et la position du fragment cloné est indiquée par une tache fluorescente brillante (figure 17-2).

BCU LAUSANNE / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

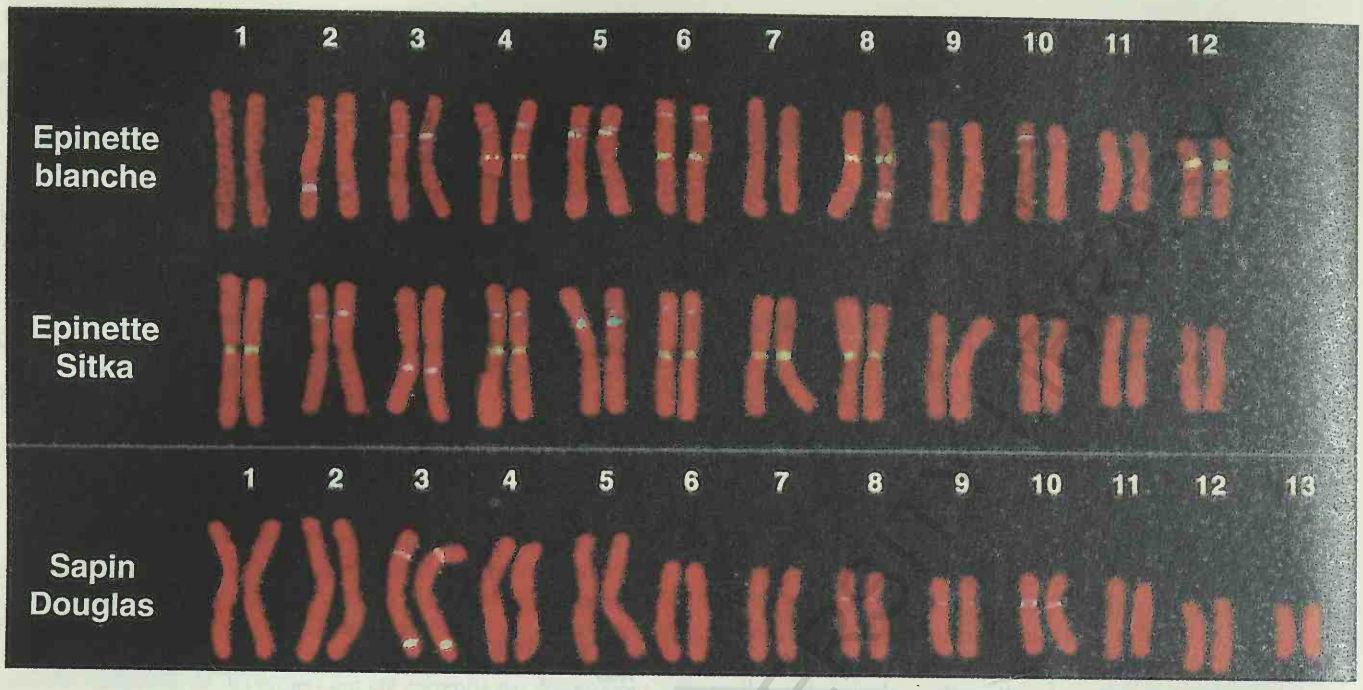


Figure 17-2. Analyse par hybridation fluorescente in situ (FISH) des chromosomes de trois espèces de conifères. Les sondes utilisées étaient des clones d'ADNr 5S (bleu), la région codant pour les ADNr 18S, 5,8S et 26S (rose) et, dans le cas des sEpinettes blanche et Sitka, un ADN satellite appelé SGR-31 (vert). Dans le cas présent, l'analyse par FISH a été entreprise pour localiser les loci, les utiliser comme marqueurs pour identifier des chromosomes spécifiques et faire des comparaisons utiles sur le plan de l'évolution entre les espèces. (Photographie de Garth Brown, Vindhya Amarasinghe et John Carlson.)

Les points de rupture des réarrangements chromosomiques

Nous avons vu au chapitre 8 que la formation d'allèles mutants est parfois associée à des réarrangements chromosomiques. Ceci est souvent dû à ce que la rupture du chromosome qui cause le réarrangement a lieu dans (ou à proximité) de la séquence codante du gène et rend celui-ci inactif. Si les ruptures sont visibles ou localisables génétiquement, il est possible d'assigner le gène à un chromosome et même de le localiser approximativement.

L'électrophorèse sur gel en champs alternés (PFGE)

Lorsque les chromosomes sont suffisamment petits pour être séparés par électrophorèse sur gel en champs alternés (PFGE pour «pulsed field gel electrophoresis» en anglais), les bandes d'ADN obtenues sur le gel peuvent servir à localiser de nouveaux gènes par hybridation (figure 17-3). En premier lieu, il faut déterminer à quel chromosome correspond une bande d'ADN. La taille, les translocations entre chromosomes connus et l'hybridation avec des sondes de localisation connue peuvent être utilisées dans ce but. Le nouveau gène cloné peut ensuite servir de sonde pour un transfert de Southern du gel de PFGE et sa localisation chromosomique être déterminée.

Hybrides de cellules somatiques humaines et de rongeurs

La technique d'hybridation de cellules somatiques est très utilisée en cartographie du génome humain, mais convient en principe pour de nombreux systèmes animaux différents. La technique utilise des cultures de cellules. Un virus, appelé le *virus de Sendai,* rend cette technique de localisation possible parce qu'il possède plusieurs points d'attachement et peut se fixer simultanément à deux cellules différentes si elles viennent à être proches. Toutefois, le virus est très petit par rapport à une cellule (un rapport similaire à celui qui existe entre la terre et le soleil) de sorte que les deux cellules sont maintenues très proches l'une de l'autre. En fait, les membranes des deux cellules peuvent fusionner et former une seule cellule (un hétérocaryon binucléé).

Si des suspensions de cellules humaines et de souris sont mélangées en présence d'un virus de Sendai qui a été inactivé par la lumière UV, le virus peut provoquer la fusion de ces cellules d'espèces différentes (figure 17-4). La fusion des cellules est suivie de la fusion des noyaux qui conduit à la formation d'une lignée cellulaire uninucléée comportant des jeux de chromosomes humains et de souris. Comme les chromosomes humains diffèrent de ceux des souris par le nombre et la forme, les deux jeux de chromosomes peuvent aisément être distingués dans les cellules hybrides. Mais au cours des divisions cellulaires ultérieures, et

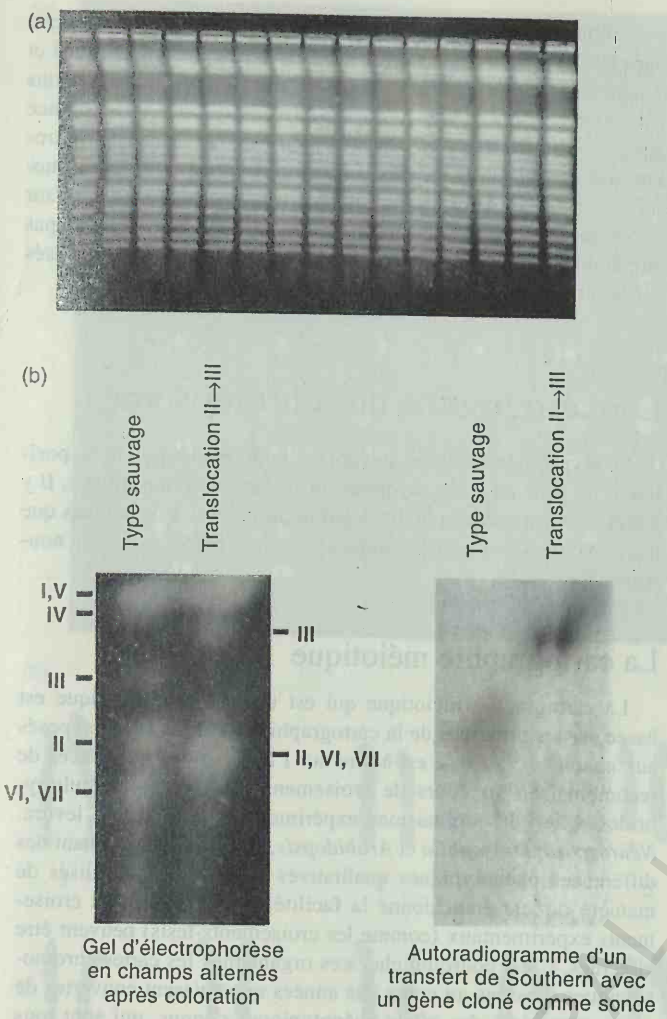


Figure 17-3. (a) Electrophorèse sur gel en champs alternés de l'ADN non digéré de différentes souches de levure. Seize bandes sont visibles. (Toutes les pistes ont été chargées de manières équivalentes.) (b) L'utilisation de l'électrophorèse sur gel en champs alternés pour séparer les chromosomes de *Neurospora* et pour localiser un gène cloné sur un segment chromosomique. (*A gauche*) Les chromosomes de type sauvage et une translocation qui a pour résultat l'insertion d'une section de 100 kb du chromosome II dans le chromosome III. (*A droite*) Autoradiogramme obtenu avec une sonde consistant en un gène cloné dont on ignorait la localisation. Les résultats montrent que le gène est localisé dans la région du chromosome II qui a été déplacée lors de la translocation. (Partie a de Bio-Rad ; partie b de Myron Smith.)

pour des raisons inconnues, les chromosomes humains sont éliminés progressivement et de manière aléatoire des cellules hybrides. Ce processus pourrait être analogue à l'haploïdisation observée chez le champignon *Aspergillus* (chapitre 6).

Afin de favoriser la formation d'un hybride partiel stable, il est possible d'arrêter la perte des chromosomes humains de la manière suivante. Les cellules de souris utlisées sont mutées pour certaines fonctions biochimiques qui, au cours de la croissance, doivent être suppléées par le génome humain. Cette technique sélective assure le maintien de cellules hybrides qui possèdent un jeu complet de chromosomes de souris et un petit nombre de chromosomes humains qui varie d'un hybride à l'autre mais comporte toujours un chromosome humain porteur de l'allèle sauvage qui est absent dans le génome de souris.

Examinons les gènes particuliers qui permettent à ce système sélectif de fonctionner. Dans une cellule, l'ADN peut être synthétisé de novo (en partant de zéro) ou par une voie de récupération qui utilise des squelettes carbonés déjà disponibles. La technique sélective implique l'emploi d'un agent chimique, l'aminoptérine, qui bloque le trajet de novo de synthèse de l'ADN et limite cette synthèse à la voie de récupération. Deux enzymes de récupération importantes interviennent dans ce système. Ils catalysent les réactions suivantes :

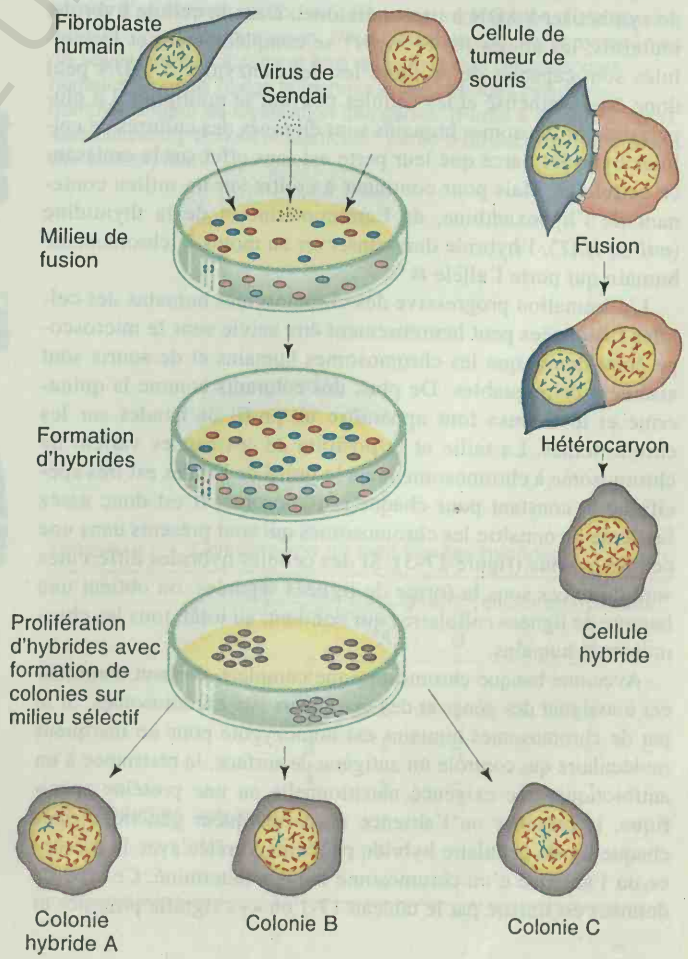
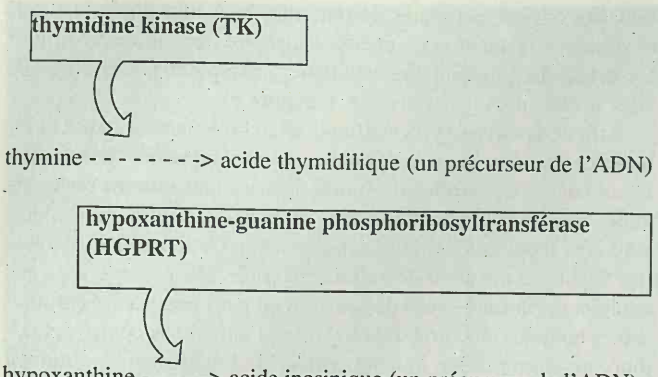


Figure 17-4. Les techniques de fusion cellulaire appliquées à des cellules humaines et de souris produisent des colonies dont chaque cellule contient un génome complet de souris et quelques chromosomes humains (bleu). Un fibroblaste est une cellule de tissu connectif fibreux. (De F. H. Ruddle et R. S. Kucherlapati, «Hybrid cells and human genes.» *Scientific American,* 1974.)

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



La lignée cellulaire de souris est génétiquement incapable de produire la TK parce qu'elle est homozygote pour l'allèle *tk*$^-$, tandis que la lignée humaine, étant homozygote pour l'allèle *hgprt*$^-$, est incapable de synthétiser l'HGPRT. Les génotypes des deux lignées cellulaires qui fusionnent sont :

souris : $tk^-\ tk^-\ hgprt^+\ hgprt^+$

humaine : $tk^+\ tk^+\ hgprt^-\ hgprt^-$

Comme chacune des lignées est déficiente en une des enzymes, ni les cellules de souris, ni les cellules humaines ne sont capables de synthétiser l'ADN à titre individuel. Dans la cellule hybride, toutefois, les allèles *tk*$^+$ et *hgprt*$^+$ se complémentent et les cellules sont capables de produire les deux enzymes. L'ADN peut donc être synthétisé et les cellules peuvent se multiplier. La plupart des chromosomes humains sont éliminés des cultures de cellules hybrides parce que leur perte est sans effet sur la croissance cellulaire. Mais pour continuer à croître sur un milieu contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine (*milieu HAT*), l'hybride doit conserver au moins le chromosome humain qui porte l'allèle *tk*$^+$.

L'élimination progressive des chromosomes humains des cellules fusionnées peut heureusement être suivie sous le microscope étant donné que les chromosomes humains et de souris sont aisément distinguables. De plus, des colorants comme la quinacrine et le Giemsa font apparaître un profil de bandes sur les chromosomes. La taille et la position de ces bandes varient de chromosome à chromosome mais le profil de bandes est très spécifique et constant pour chaque chromosome. Il est donc assez facile de reconnaître les chromosomes qui sont présents dans une cellule hybride (figure 17-5). Si des cellules hybrides différentes sont cultivées sous la forme de lignées séparées, on obtient une banque de lignées cellulaires qui contient, au total, tous les chromosomes humains.

Avec une banque chromosomique complète, on peut commencer à assigner des gènes et des marqueurs aux chromosomes. Si le jeu de chromosomes humains est homozygote pour un marqueur moléculaire qui contrôle un antigène de surface, la résistance à un antibiotique, une exigence nutritionnelle ou une protéine spécifique, la présence ou l'absence de ce marqueur génétique dans chaque lignée cellulaire hybride peut être corrélée avec la présence ou l'absence d'un chromosome humain déterminé. Ce type de données est illustré par le tableau 17-1 où «+» signifie présence et «–» signifie absence du marqueur génétique. Nous voyons que dans les différentes lignées hybrides les marqueurs génétiques 1 et 3 sont toujours présents ou absents simultanément. Nous pouvons donc conclure qu'ils sont liés. De plus, la présence ou l'absence des gènes 1 et 3 est corrélée avec la présence ou l'absence du chromosome 2, suggérant que ces gènes sont localisés sur ce chromosome. Le même raisonnement indique que le gène 2 se trouve sur le chromosome 1 ; par contre, la localisation du gène 4 ne peut pas être établie. Un grand nombre de gènes humains ont été localisés sur les chromosomes de cette manière.

La cartographie des chromosomes

Le niveau de résolution suivant est la détermination de la position d'un gène ou d'un marqueur sur la carte chromosomique. Il y a plusieurs approches possibles qui impliquent des techniques que nous avons déjà discutées auparavant et d'autres qui sont nouvelles.

La cartographie méiotique

La cartographie méiotique qui est utilisée en génomique est basée sur les principes de la cartographie que nous avons exposés aux chapitres 5 et 6, c'est-à-dire sur l'analyse des fréquences de recombinaison au cours de croisements dihybrides et multihybrides. Chez des organismes expérimentaux tels que la levure, *Neurospora*, *Drosophila* et *Arabidopsis*, les gènes déterminant des différences phénotypiques qualitatives peuvent être localisés de manière directe étant donné la facilité avec laquelle des croisements expérimentaux (comme les croisements-tests) peuvent être effectués. C'est pourquoi chez ces organismes les cartes chromosomiques dressées au cours des années apparaissent couvertes de gènes associés à des effets phénotypiques connus, qui sont tous localisés avec précision.

Ce n'est pas le cas pour l'homme où on n'effectue pas de croisements expérimentaux, où la taille des échantillons est trop faible pour permettre une détermination statistique précise des liaisons et dont le génome est énorme. Même l'assignation d'un gène de maladie humaine à un autosome spécifique s'est avérée une tâche difficile par l'analyse des liaisons. Le développement de techniques de cartographie basées sur les hybrides de cellules humaines et de rongeurs est apparu comme un progrès essentiel parce qu'il a permis d'assigner un grand nombre de gènes humains à des chromosomes spécifiques et, dans certains cas, de les localiser approximativement sur ces chromosomes. (Nous parlerons de ces techniques dans la section suivante).

Même chez les organismes dont les cartes chromosomiques semblent «pleines» de gènes liés à des effets phénotypiques connus, les mesures ont montré que les intervalles entre les gènes contiennent de grandes quantités d'ADN. Ces régions étaient inaccessibles à l'analyse génétique parce qu'aucun marqueur n'y était localisé. Ce qu'il fallait, c'était un grand nombre de marqueurs génétiques supplémentaires à utiliser pour combler les vides et établir une carte à haute résolution. Cette exigence fut satisfaite grâce à la découverte de divers types de **marqueurs moléculaires**. Un marqueur moléculaire est un site d'hétérozygotie pour une certaine **variation neutre de l'ADN**. Une variation est neutre si elle n'est associée à aucun changement phénotypique mesurable. Un

(a)

(b)

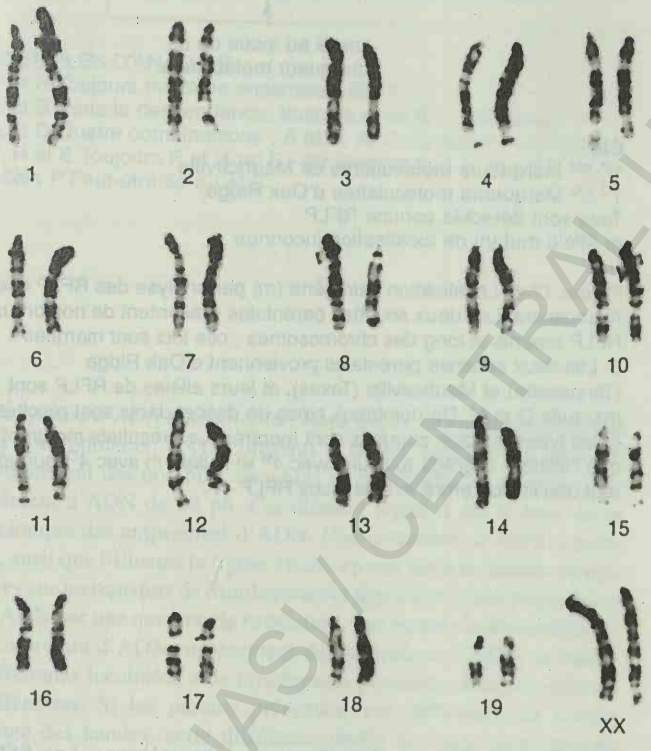


Figure 17-5. (a) Chromosomes humains colorés. Sous le microscope, les chromosomes sont groupés pêle-mêle comme on le voit à droite. Cet ensemble est photographié et les chromosomes individuels sont découpés de la photographie et groupés par tailles et profils de bandes comme on le voit à gauche. Le jeu de chromosomes d'un homme est montré. (b) Les chromosomes d'une souris femelle, pour la comparaison. Pour un œil exercé, les chromosomes de souris peuvent aisément être distingués des chromosomes humains, comme l'exige la technique des hybrides cellulaires homme-rongeur de localisation des gènes. (Partie a de David Ward, Yale University School of Medicine ; partie b du Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me.)

tel «locus d'ADN», lorsqu'il est à l'état hétérozygote, peut être utilisé pour l'analyse cartographique comme une paire d'allèles hétérozygotes classiques. Notez que, pour la cartographie, la signification biologique de l'ADN marqueur n'est pas importante en elle-même ; le site hétérozygote est simplement un point de référence commode pour se situer dans le génome. Les marqueurs sont utilisés de la même manière que les bornes kilométriques le long des routes. Ces bornes marquent chaque kilomètre sur les routes

Tableau 17-1. Comparaison de cinq lignées hybrides

		Lignées cellulaires hybrides				
		A	B	C	D	E
Gènes humains	1	+	–	–	+	–
	2	–	+	–	+	–
	3	+	–	–	+	–
	4	+	+	+	–	–
Chromosomes humains	1	–	+	–	+	–
	2	+	–	–	+	–
	3	–	–	–	+	+

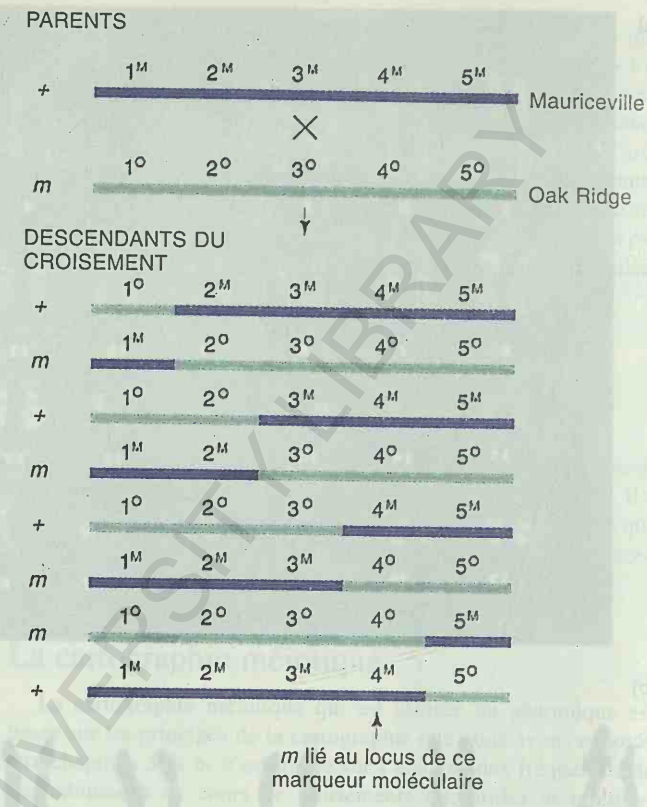
UJIAS / CENTRAL UNIVERSITY

qui séparent les villes et indiquent aux voyageurs où ils sont sur la carte. Ces voyageurs sont désireux de parvenir à leur destination mais ne sont pas intéressés par les bornes (marqueurs) en tant que telles. Pourtant, sans elles, ils se perdraient.

Les polymorphismes de longueur de fragments de restriction. Les premiers exemples d'utilisation de variations neutres de l'ADN comme marqueurs en cartographie furent décrits dans les années 1980. Ce sont les **polymorphismes de longueur de fragments de restriction** (**RFLP** pour «restriction fragment length polymorphisms» en anglais). Les RFLP peuvent avoir plusieurs causes au niveau de l'ADN mais ils sont souvent simplement causés par la présence ou l'absence de la cible d'une enzyme de restriction—une différence d'une seule base peut même en être responsable (voir au chapitre 15). Les RFLP sont identifiés par une méthode d'hybridation au hasard d'une collection de clones génomiques avec l'ADN, préalablement digéré par une enzyme de restriction, de plusieurs individus appartenant à une famille ou à une population. Les RFLP étant assez courants dans la nature, cette méthode permet d'identifier des RFLP chez la plupart des organismes.

La cartographie par les RFLP est souvent réalisée sur un ensemble défini de souches ou d'individus qui jouent ensuite le rôle de standards pour la cartographie de cette espèce. Dans le cas du champignon *Neurospora*, par exemple, les souches sauvages Oak Ridge et Mauriceville montrent de nombreuses différences de RFLP et sont devenues les standards utilisés pour la cartographie par les RFLP. Les RFLP peuvent être localisés les uns par rapport aux autres ou par rapport à des gènes d'expression phénotypique connue. Par exemple, on peut faire un croisement du type *ad* 1^{OR} 2^{OR} x *ad*$^+$ 1^M 2^M où *ad* représente une «exigence» en adénine et 1 et 2 sont des loci de RFLP comportant les «allèles» Oak Ridge (OR) ou Mauriceville (M). Les descendants sont testés pour les trois loci et les fréquences de recombinaison sont mesurées de la manière habituelle. Des cartes détaillées des RFLP sont actuellement disponibles. La plupart des mutants de *Neurospora* ont été obtenus à partir de la souche sauvage Oak Ridge, de telle sorte qu'il est très simple de localiser les allèles mutés par rapport aux RFLP en croisant les souches mutantes Oak Ridge avec la souche sauvage Mauriceville. Un exemple de localisation d'une mutation à l'aide de marqueurs RFLP est présenté dans la figure 17-6.

Des souches standard analogues ont été développées pour d'autres organismes. De plus une approche similaire a été utilisée pour le projet de cartographie du génome humain en récoltant l'ADN d'un ensemble défini d'individus appartenant à 61 familles, avec une moyenne de 8 enfants par famille. Cet ADN a été distribué dans le monde entier pour servir de standard pour la localisation au moyen de marqueurs d'ADN.



Clé
1^M-5^M Marqueurs moléculaires de Mauriceville
1^O-5° Marqueurs moléculaires d'Oak Ridge
Tous sont détectés comme RFLP
m Allèle mutant de localisation inconnue

Figure 17-6. Localisation d'un gène (*m*) par analyse des RFLP chez *Neurospora*. Les deux souches parentales présentent de nombreux RFLP répartis le long des chromosomes ; ces loci sont marqués 1 à 5. Les deux souches parentales proviennent d'Oak Ridge (Tennessee) et Mauriceville (Texas), et leurs allèles de RFLP sont marqués O et M. De nombreux types de descendants sont récoltés et les types les plus courants sont montrés. Les résultats montrent que l'allèle + ségrège toujours avec 4^M et l'allèle *m* avec 4°, suggérant une liaison entre *m* et le locus RFLP 4. .

Marqueurs d'ADN basés sur la variation du nombre de courtes séquences répétées. Si les RFLP se sont montrés utiles pour la cartographie du génome humain, ils sont maintenant largement remplacés dans l'analyse de routine par des marqueurs basés sur la variation du nombre de courtes répétitions en tandem. Ces marqueurs sont appelés **polymorphismes de longueur de séquences simples** (**SSLP** pour «simple sequence length polymorphisms» en anglais). Ils présentent deux avantages par rapport aux RFLP. Premièrement, dans le cas des RFLP, on ne trouve en général que deux «allèles» dans l'arbre généalogique ou dans la population. Ceci limite leur utilité et il serait préférable de disposer d'un plus grand nombre d'allèles qui puissent servir d'étiquettes pour diverses régions chromosomiques homologues. Les SSLP satisfont à cette exigence parce que l'allélisme multiple y est beaucoup plus fréquent et qu'on a trouvé jusqu'à 15 allèles pour un locus. Deuxièmement, l'hétérozygotie peut être faible pour les RFLP ; en d'autres mots, si un allèle est relativement rare par rapport à l'autre, la proportion d'hétérozygotes (les individus essentiels pour la localisation) sera faible. Mais les SSLP, outre l'avantage de posséder de nombreux allèles, montrent un niveau d'hétérozygotie beaucoup plus élevé, ce qui les rend plus appropriés pour la cartographie. Deux types de SSLP sont couramment utilisés en cartographie humaine.

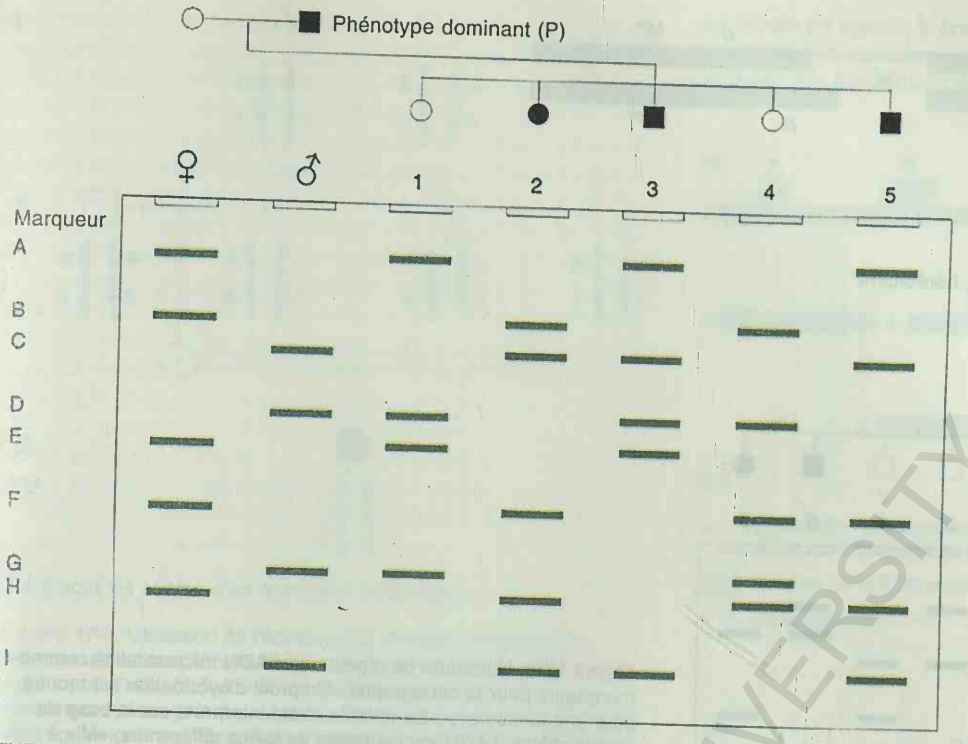


Figure 17-7. L'utilisation des bandes des empreintes d'ADN comme marqueurs pour la cartographie. Des empreintes simplifiées sont montrées pour les parents et cinq descendants. Les exemples illustrent les méthodes d'analyse des liaisons. Les marqueurs moléculaires peuvent être localisés les uns par rapport aux autres ou par rapport à un locus d'expression phénotypique connue.

Marqueurs d'ADN minisatellite. Nous avons vu au chapitre 16 que les loci humains VNTR présents à divers endroits du génome contiennent des nombres variables de répétitions en tandem d'un élément d'ADN de 33 pb. Cet élément répétitif est la base de la technique des empreintes d'ADN. Une empreinte d'ADN consiste, ainsi que l'illustre la figure 16-28, en une série de bandes observées sur un transfert de Southern après digestion d'une préparation d'ADN par une enzyme de restriction. Les bandes individuelles de l'empreinte d'ADN représentent des séquences d'ADN de tailles différentes localisées à de nombreuses positions chromosomiques différentes. Si les parents présentent une différence au niveau d'une des bandes, cette différence révèle un locus hétérozygote («plus / moins») utilisable pour la cartographie. Un exemple simple est présenté dans la figure 17-7.

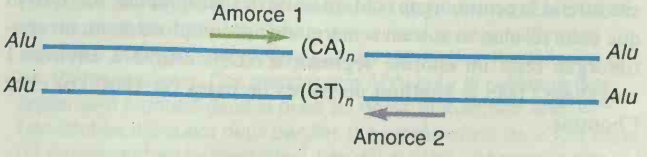
La sonde qui détecte les variations d'ADN minisatellite humain révèle aussi des empreintes d'ADN chez un nombre étonnant d'autres organismes et la technique peut également être utilisée pour la cartographie chez ces organismes.

Marqueurs d'ADN microsatellite. L'ADN microsatellite est une classe d'ADN répétitif comportant des répétitions de dinucléotides. Le type le plus courant est une répétition de CA et de son complément GT, comme dans l'exemple suivant :

5' . . . . . C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-

3' . . . . . G-T-G-T-G-T-G-T-G-T-G-T-G-T-G-T-G-T-

Les sondes utilisées pour détecter ces marqueurs sont préparées à l'aide de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR ; voir au chapitre 14). Tout d'abord, la digestion de l'ADN humain par l'enzyme de restriction *Alu*1 fournit des fragments d'une longueur moyenne de 400 pb qui sont clonés dans le phage M13. Les phages porteurs d'un insert $(CA)_n$ / $(GT)_n$ sont identifiés par hybridation avec une sonde $(CA)_n$ / $(GT)_n$. Les clones positifs sont séquencés et des paires d'amorces pour la PCR basées sur les séquences flanquant le segment répétitif dans les différents clones sont synthétisées :



Les amorces sont utilisées pour amplifier l'ADN avec de l'ADN génomique comme substrat. La paire d'amorces d'un individu amplifiera son propre segment répétitf ainsi que tout variant de celui-ci présent dans l'ADN d'un individu différent. Une propor-

BRANCH CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

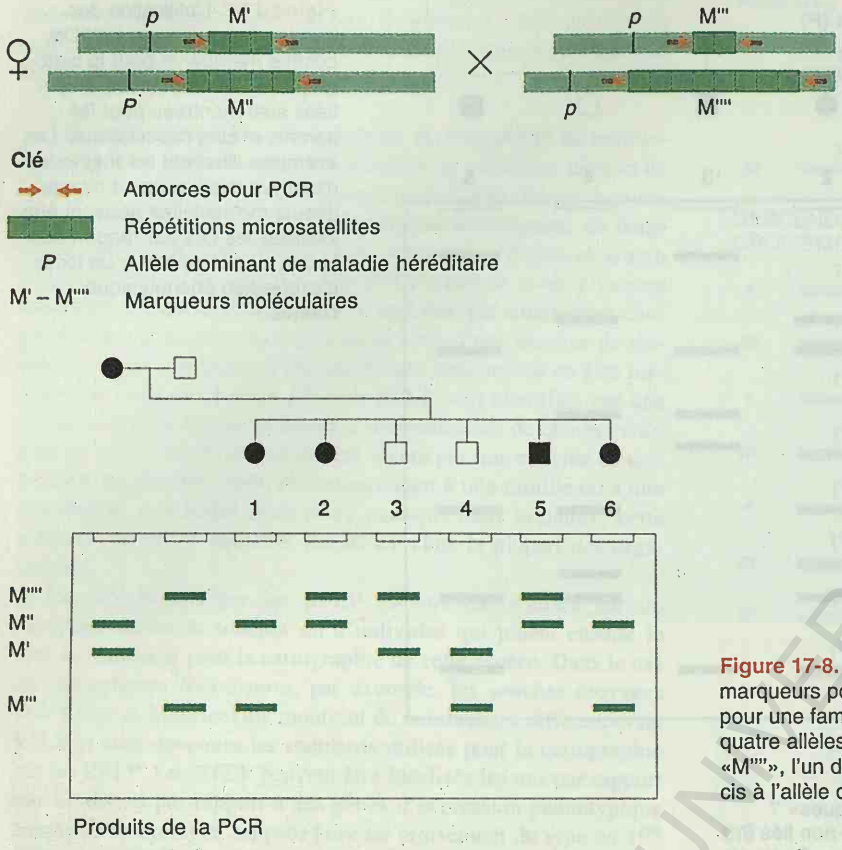


Figure 17-8. Utilisation de répétitions d'ADN microsatellite comme marqueurs pour la cartographie. Un profil d'hybridation est montré pour une famille avec six enfants et est interprété sur la base de quatre allèles d'ADN microsatellite de tailles différentes, «M'» à «M''''», l'un d'entre eux (M'') étant probablement lié en configuration cis à l'allèle de maladie *P*.

tion élevée des paires d'amorces de PCR révèle au moins trois allèles marqueurs dont les produits d'amplification ont des tailles différentes. Un exemple d'application de cette technique est montré dans la figure 17-8. Des milliers de paires d'amorces qui détectent des milliers de loci marqueurs peuvent être préparées. La carte par marqueurs d'ADN microsatellite la plus récente du chromosome 1 est montrée dans la figure 5-18.

Il faut noter certaines différences de commodité entre les analyses par RFLP et par SSLP. L'analyse par RFLP exige de disposer au laboratoire d'une sonde spécifique obtenue par clonage pour la détection de chaque locus marqueur individuel. L'analyse par microsatellite nécessite une paire d'amorce pour chaque locus marqueur mais ces séquences d'amorces sont aisément distribuées dans le monde par courrier électronique et rapidement synthétisées à l'aide d'un synthétiseur d'ADN. L'analyse par minisatellites requiert uniquement une sonde capable de détecter, en des endroits quelconques du génome, la partie centrale de l'élément répétitif.

Ensemble, les découvertes des marqueurs RFLP et SSLP ont permis la construction d'une carte génétique humaine dont la densité atteint le centimorgan (cM ou unité de cartographie, u.c.). Bien que cette résolution soit un remarquable accomplissement, un centimorgan reste un énorme segment d'ADN, estimé à environ 1 mégabase (1Mb = 1million de paires de bases ou 1000 kb) chez l'homme.

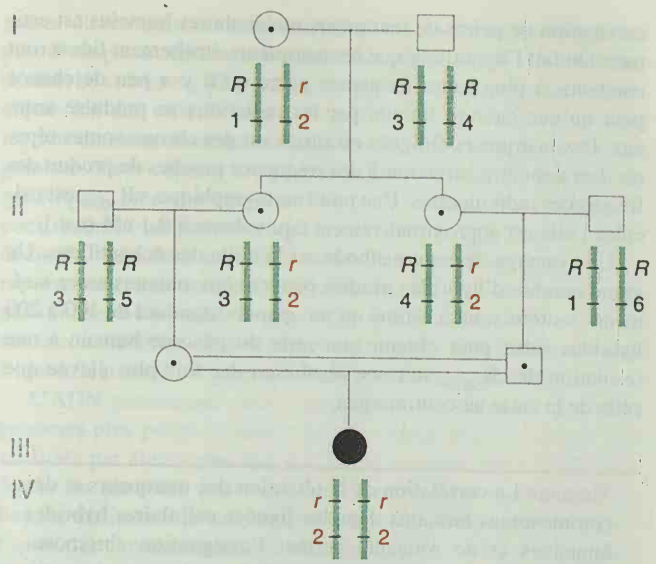
Message L'analyse par la recombinaison méiotique de la localisation de gènes à effets phénotypiques connus et de marqueurs RFLP et SSLP a produit une carte du génome humain qui est saturée juqu'au niveau de 1 centimorgan (1 unité cartographique).

L'analyse par RFLP convient pour la plupart des organismes. L'analyse par SSLP s'applique à d'autres mammifères comme la souris et en principe son domaine d'application est plus large encore.

Les autres techniques de localisation méiotique. Plusieurs autres manières d'aborder la cartographie méiotique des marqueurs moléculaires ont été envisagées.

Détermination moléculaire du génotype des spermatozoïdes Nous avons vu au chapitre 6 que le génotype des spermatozoïdes humains ou d'autres animaux peut être déterminé au niveau moléculaire, réduisant ainsi l'analyse méiotique animale à une simple analyse d'ascospores fongiques. Cette analyse du génotype doit se faire par PCR parce que le contenu en ADN d'un seul spermatozoïde est trop faible pour une manipulation directe. Les spermatozoïdes sont isolés et introduits par dilution dans des tubes séparés. Ils sont ensuite cassés et leur ADN est analysé pour la présence d'allèles marqueurs en utilisant des amorces de PCR appropriées.

Analyse de l'homozygotie Cette approche, qui est utile pour la cartographie du génome humain, est basée sur des généalogies dans lesquelles un allèle mendélien récessif a été rendu homozygote par mariage consanguin, comme à la figure 17-9. L'allèle récessif peut être retrouvé chez un ancêtre particulier. Cet ancêtre et son (ou sa) partenaire peuvent alors être analysés pour un grand nombre de marqueurs moléculaires tels que des RFLP et des SSLP. Si l'individu porteur du génotype homozygote récessif est également homozygote par hérédité pour un des marqueurs moléculaires, il y a de fortes chances (mais pas une certitude) pour que le marqueur moléculaire soit lié à l'allèle mendélien ; sinon, le marqueur aurait



1 à 6 sont les allèles d'un marqueur moléculaire.

Figure 17-9. Utilisation de l'homozygotie d'origine familiale pour détecter une liaison. L'individu de la génération IV est devenu homozygote pour l'allèle autosomal récessif *r* à cause d'un mariage consanguin (mariage entre cousins). On constata que cette personne était également homozygote pour le marqueur moléculaire 2 qui doit provenir de la femme de la génération 1. Les allèles *r* et 2 étaient très probablement liés sur le même chromosome chez cette femme et ont été transmis comme un ensemble pendant trois générations.

ségrégé indépendamment et aurait donc moins de chances d'être devenu homozygote par hérédité.

Les ADN polymorphes amplifiés au hasard (RAPD pour «randomly amplified polymorphic DNAs», en anglais) Une amorce de PCR unique, choisie au hasard, permet souvent d'amplifier différentes régions du génome. La séquence unique détecte des segments d'ADN flanqués de deux copies inversées de la séquence de l'amorce. Le résultat est une collection de bandes d'ADN amplifiées de tailles différentes (figure 17-10). Dans un croisement, certaines de ces bandes amplifiées peuvent être restreintes à un seul parent, auquel cas elles peuvent être considérées comme correspondant à des loci hétérozygotes (plus / moins) et être utilisées comme des marqueurs moléculaires dans l'analyse cartographique. Notez également que la collection de fragments d'ADN amplifiés (appelés *RAPD*) est un autre type d'empreinte génétique qui peut servir à caractériser un individu. De telles plaques d'identité peuvent être utiles dans l'analyse génétique courante ou dans l'étude des populations.

La cartographie des chromosomes au moyen d'hybrides de cellules humaines et de rongeurs

Plus haut dans ce chapitre, nous avons abordé l'utilisation des hybrides de cellules humaines et de rongeurs pour assigner les gènes aux chromosomes. Cette technique peut être étendue pour obtenir des données cartographiques. Une première extension de la technique est appelée le **transfert de gènes effectué par les chromosomes** (chromosome-mediated gene transfer, en anglais). Tout d'abord, des échantillons de chromosomes humains sont isolés au

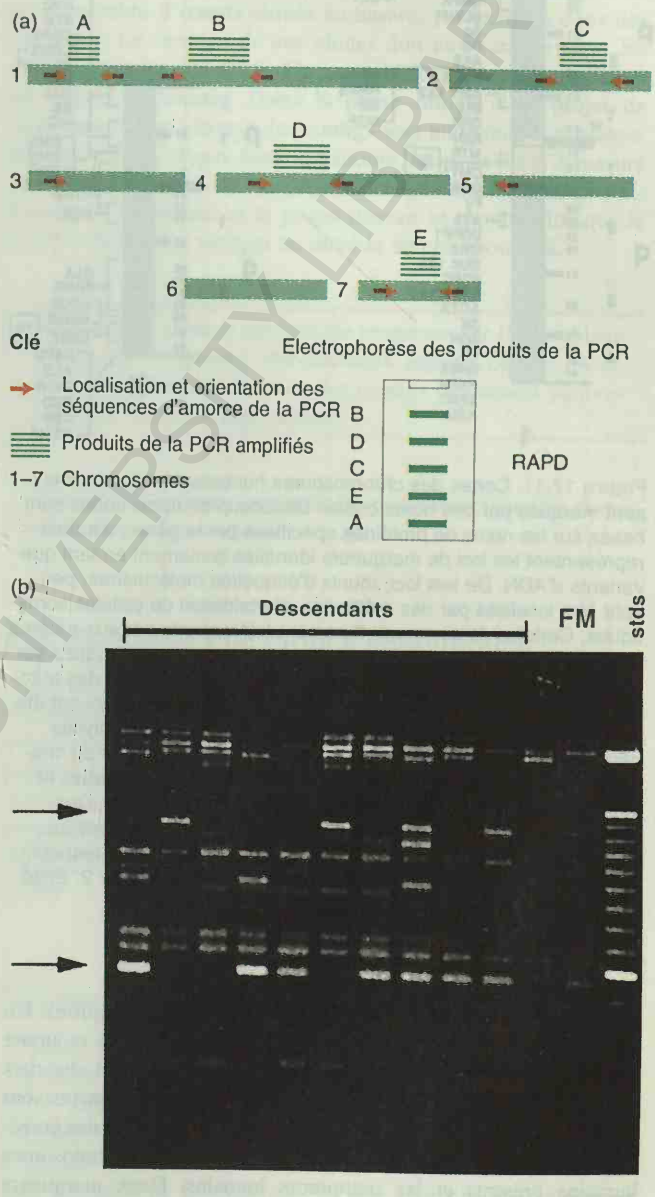


Figure 17-10. (a) L'analyse des ADN polymorphes amplifiés au hasard (RAPD) fournit des marqueurs chromosomiques moléculaires. Si une autre souche est dépourvue d'une des bandes, celle-ci peut être considérée comme un locus marqueur hétérozygote et utilisée pour la cartographie comme dans l'exemple de la partie b. (b) L'analyse par les RAPD d'un croisement dans une espèce d'arbre. Une amorce de 10 nucléotides a été utilisée pour amplifier des régions d'ADN génomique des parents (M = mâle, F = femelle) et de 10 descendants. Des standards d'ADN pour le calibrage des tailles sont montrés dans la piste de droite et marqués «stds». Les flèches indiquent deux bandes qui représentent deux loci dans un croisement-test «dihybride». Les deux allèles de chacun des deux loci sont exprimés en présence et en absence d'une bande RAPD. Des parents, seule la plante mâle montrait ces bandes mais elle devait être hétérozygote pour la présence (allèle +) et l'absence (allèle –) de bandes aux deux loci. La plante mâle pourrait être désignée $1^+\,1^-\,2^+\,2^-$ et la plante femelle $1^-\,1^-\,2^-\,2^-$. Les descendants présentent diverses combinaisons de ces allèles. (John E. Carlson)

BCU LAUSANNE - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

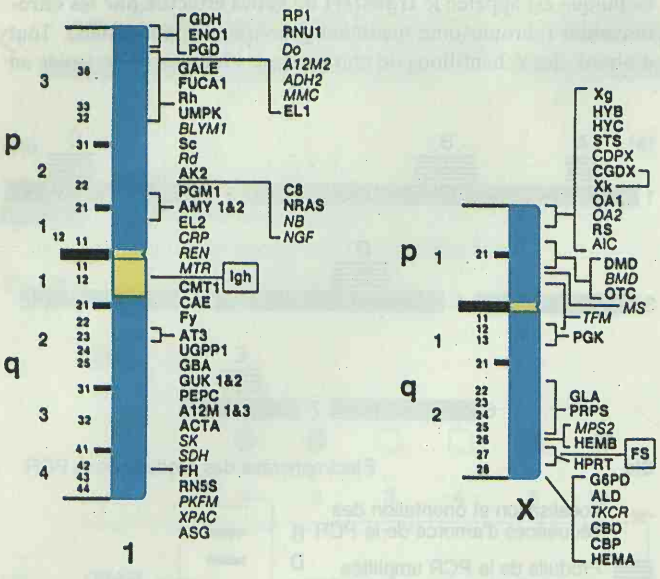


Figure 17-11. Cartes des chromosomes humains 1 et X. Les loci sont marqués par des noms codes. Beaucoup de noms codes sont basés sur les noms de protéines spécifiées par le gène ; d'autres représentent les loci de marqueurs identifiés seulement en tant que variants d'ADN. De tels loci, munis d'étiquettes moléculaires, peuvent être localisés par des méthodes d'hybridation de cellules somatiques. Certains de ces marqueurs sont intéressants par eux-mêmes tandis que certains sont utiles comme repères chromosomiques par rapport auxquels d'autres loci peuvent être localisés. Pour des autosomes comme le chromosome 1, environ deux tiers des loci ont été assignés par hybridation somatique et le reste par des analyses généalogiques. Comparez ces cartes avec celles du début du chapitre 5, qui répertorient divers gènes déterminant des maladies et autres phénotypes et sont localisés sur ces chromosomes. Des variants protéiques sont à la base de la plupart de ces affections. Les bras courts et longs des chromosomes sont désignés respectivement par p et q. (De V. A. McKusick, *Genetic Maps*. Vol. 2. Edité par S. J. O'Brien. Cold Spring Harbor, 1982.)

moyen de trieurs de cellules (voir plus loin dans ce chapitre). Un échantillon du chromosome à l'étude est ensuite prélevé et ajouté aux cellules de rongeur. Les chromosomes humains sont absorbés par ces cellules et des chromosomes entiers ou des fragments sont incorporés dans le noyau du rongeur. On établit ensuite des corrélations entre les chromosomes ou fragments de chromosomes humains présents et les marqueurs humains. Deux marqueurs humains seront transmis ensemble d'autant plus souvent qu'ils sont proches sur un chromosome. Des résultats de ce genre sont présentés dans la figure 17-11.

Une deuxième méthode, appelée le **transfert de gènes par irradiation et fusion** (**IFTG** pour «irradiation and fusion gene transfer», en anglais) est une extension de la technique précédente en vue de fournir une carte à plus haute résolution des marqueurs moléculaires le long d'un chromosome. Le processus consiste à irradier des cellules humaines à une dose de rayons X de 3.000 rads) et à les fusionner avec des cellules de rongeurs pour former une collection d'hybrides différents. Ces hybrides possèdent un assortiment de fragments de chromosomes humains, comme le schématise la figure 17-12. La plupart des fragments sont intégrés dans les chromosomes de rongeur mais on trouve aussi des chromosomes humains tronqués. On calcule d'abord la rétention des différents marqueurs dans les hybrides. Ensuite, la fréquence de corétention de paires de marqueurs moléculaires humains est estimée. On fait l'hypothèse que les marqueurs étroitement liés seront coretenus à plus haute fréquence parce qu'il y a peu de chance pour qu'une cassure induite par les radiations se produise entre eux. Des marqueurs éloignés ou situés sur des chromosomes séparés devraient être coretenus à des fréquence proches du produit des fréquences individuelles. Une unité cartographique, cR_{3000}, est calculée ; elle est approximativement équivalente à 0,1 cM (u.c.).

Un avantage de cette méthode est la taille des échantillons. Un grand nombre d'hybrides irradiés peuvent être obtenus assez aisément ; toutefois, on a estimé qu'un «panel» standard de 100 à 200 hybrides suffit pour obtenir une carte du génome humain à une résolution de cR_{3000}, soit une résolution dix fois plus élevée que celle de la carte au centimorgan.

Message La corrélation de la rétention des marqueurs et des chromosomes humains dans les lignées cellulaires hybrides humaines et de rongeurs permet l'assignation chromosomique des marqueurs. La mesure de la corétention des marqueurs humains dans les hybrides irradiés aux rayons X permet la localisation chromosomique à haute résolution des marqueurs.

La cartographie physique des génomes

Comment la résolution du processus cartographique peut-elle encore être accrue ? Ce surcroît de résolution est obtenu en mani-

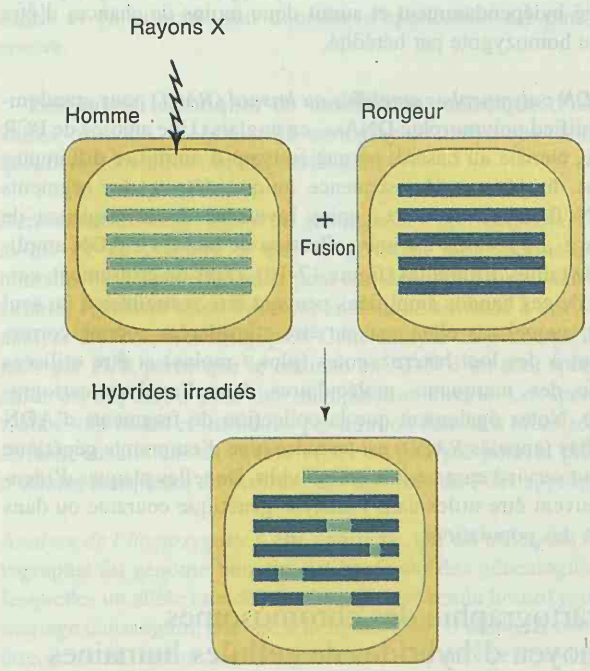


Figure 17-12. La création d'hybrides irradiés par irradiation aux rayons X. Des fragments de chromosomes humains s'intègrent dans les chromosomes de rongeurs. Un ensemble d'hybrides irradiés différents est analysé en vue d'y détecter des cotransferts de marqueurs humains, qui peuvent indiquer une liaison.

pulant directement les fragments d'ADN, qu'ils soient clonés ou pas. Puisque l'ADN est le matériau physique du génome, la démarche suivie est généralement appelée la **cartographie physique**. Un des buts de cette démarche est de produire une collection de clones couvrant la totalité d'un chromosome ou d'un génome. Ceci répond à deux objectifs. Primo, les marqueurs génétiques présents dans les clones peuvent être alignés et contribueront au processus global de cartographie du génome. Secundo, une fois que des clones contigus sont obtenus, ils représentent une banque ordonnée de séquences d'ADN qui peuvent servir à l'analyse génétique, par exemple pour la caractérisation détaillée d'une région génétique spécifique ou pour l'identification d'un gène précédemment non caractérisé.

L'ADN génomique intact est difficile à manipuler. Certains génomes plus petits comme ceux des champignons peuvent être analysés par électrophorèse sur gel en champs alternés (PFGE). Après un parcours prolongé, les chromosomes se séparent en bandes distinctes qu'on peut identifier à l'aide de sondes spécifiques des chromosomes (voir la figure 17-2). Néanmoins, pour la plupart des génomes, les chromosomes sont trop grands et trop nombreux pour cette technique. Des enzymes de restriction à cible rare («long-cutters ou rare-cutting restriction enzyme» en anglais) comme *Not*1 coupent l'ADN chromosomique en fragments plus maniables dont beaucoup sont séparables par la PFGE. Une carte de restriction à grande échelle (voir au chapitre 15) pourrait être construite au moyen de plusieurs enzymes de ce genre. Cette démarche s'est montrée fructueuse mais elle est limitée par la rareté des enzymes adéquates et la distribution non aléatoire des séquences cibles de ces enzymes.

On développe actuellement une technologie pour la détermination directe au microscope des sites de restriction sur les chromosomes entiers. Une méthode, développée chez la levure, est appelée la **cartographie optique**. Un échantillon déprotéinisé d'un chromosome de levure (récolté après électrophorèse sur gel en champs alternés) est placé dans un gel fondu et, tandis que le gel refroidit, les chromosomes sont étirés en favorisant la circulation du liquide dans le gel. Lorsqu'ils sont à l'état étiré, les chromosomes sont traités avec des enzymes de restriction. Les cibles de ceux-ci deviennent visibles sous la forme de vides dont la taille augmente avec le temps. La longueur des fragments peut être mesurée optiquement et une carte de restriction ordonnée est obtenue. Cette méthode présente l'avantage, sur les cartes de restriction classiques qui mesurent les tailles de fragments par migration sur gel et exigent des quantités d'ADN importantes, de ne nécessiter qu'un petit nombre de chromosomes.

Une autre technique physique, qui peut être utile chez *Neurospora* et chez l'homme, consiste à couper des portions spécifiques des chromosomes sous le microscope en utilisant un micromanipulateur et des microinstruments. Ces morceaux de chromosomes contiennent très peu d'ADN mais peuvent être amplifiés par PCR.

Toutefois, les fragments d'ADN génomique clonés sont d'une application plus générale et d'une plus grande utilité. Les cosmides, les YAC (chromosomes artificiels de levure) et les BAC (chromosomes artificiels de bactéries) se sont montrés les vecteurs les plus utiles pour le clonage de génomes entiers. Mais l'ampleur de la tâche est décourageante. Même les soi-disant petits génomes sont encore très grands. Considérons par exemple le génome de 100 Mb du petit nématode *Caenorhabditis elegans* ; puisqu'un insert de cosmide mesure environ 40 kb, il faut au moins 2500 cosmides pour couvrir ce génome. Les YAC peuvent contenir de l'ordre de 1 Mb et la tâche est donc plus facile

Le clonage d'un génome entier commence par la collecte d'un grand nombre d'inserts clonés au hasard, par exemple dans des cosmides. Le contenu de ces clones doit être caractérisé et les chevauchements identifiés. Un ensemble de clones chevauchants est appelé un **contig**. Dans la phase initiale d'un projet de séquençage d'un génome, les contigs sont nombreux et représentent des «îlots» clonés dans le génome. Mais au fur et à mesure que le nombre de clones caractérisés augmente, les contigs s'allongent et fusionnent et le projet devrait se terminer lorsque le nombre de contigs est égal au nombre de chromosomes.

Message Le clonage génomique progresse par l'assemblage de clones en groupes chevauchants appelés contigs. Avec l'accumulation des données, les contigs deviennent équivalents aux chromosomes entiers.

Plusieurs techniques sont utilisées pour caractériser les clones. Nous en considérerons trois.

Les empreintes de clones génomiques

L'insert génomique porté par un vecteur possède une séquence unique qui peut produire, après digestion multiple par des enzymes de restriction, un profil de bandes qui représente l'empreinte génétique unique de ce clone. Les profils fournis par des clones séparés peuvent être alignés visuellement ou à l'aide d'un programme d'ordinateur pour déterminer s'il existe des chevauchements entre les inserts d'ADN. C'est ainsi qu'on bâtit un contig.

Séquences marqueurs(STS)

Si de courtes séquences uniques pouvaient être identifiées dans de grands inserts clonés, elles pourraient servir à aligner les divers clones pour former des contigs. On pourrait par exemple constater que le clone A contient les séquences 1 et 2 et le clone B les séqences 2 et 3. Ces clones devraient donc se chevaucher dans la région de la séquence 2. Cette approche est maintenant possible. La démarche consiste encore une fois à accumuler un grand nombre de clones contenant de courts inserts génomiques (dans le phage λ par exemple) et à séquencer de courtes régions de chacun. A partir de ces séquences, des paires d'amorces de PCR sont choisies afin d'amplifier les courtes séquences d'ADN qui sont flanquées par ces amorces. Ces courtes séquences d'ADN sont appelées des **séquences marqueurs** (**STS** pour «sequence-tagged sites» en anglais). Bien qu'on ignore leurs localisations dans le génome, un jeu de STS peut être utilisé pour caractériser les clones contenant de grands inserts d'ADN (dans des YAC par exemple). Les clones qui ont des STS spécifiques en commun contiennent des inserts chevauchants et seront alignés pour former des contigs. Cette technique est illustrée dans la figure 17-13.

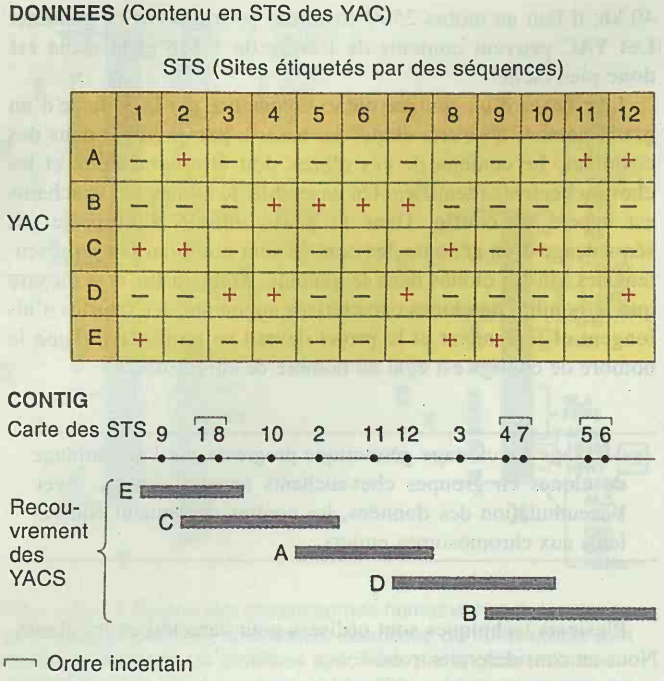


Figure 17-13. L'utilisation de séquences marqueurs (STS) pour ordonner des clones chevauchants (des YAC, par exemple) et former des contigs. Six YAC différents sont testés pour déterminer quels STS ils contiennent (en haut) et ces données sont utilisées pour dresser une carte physique (en bas).

Séquençage aléatoire

Le projet de séquençage du génome de la bactérie *Haemophilus influenzae* a fait appel à une stratégie différente mais similaire pour aligner les clones. L'ADN génomique a été cisaillé mécaniquement et cloné à l'aveugle pour obtenir au hasard un grand nombre de clones présumés se chevaucher de diverses manières. Des amorces basées sur l'ADN adjacent du vecteur furent utilisées pour séquencer de courtes régions situées aux extrémités des inserts clonés d'*Haemophilus*. Ensuite, ces courtes séquences furent utilisées (comme des séquences marqueurs) pour aligner les clones génomiques. Les nombreuses courtes séquences aléatoires obtenues suffirent à couvrir la plus grande partie du génome d'*Haemophilus*. Les trous furent remplis par une «marche avec des amorces», c'est-à-dire en se servant de l'extrémité d'une séquence clonée comme amorce pour séquencer les fragments non clonés adjacents. (L'organisation de la séquence génomique entière est présentée dans la figure 17-18).

La combinaison de ces méthodes physiques a conduit au clonage des chromosomes et des génomes entiers de divers organismes expérimentaux. Le génome de *C. elegans*, par exemple, est maintenant disponible sous la forme d'une collection de contigs de cosmides ou de YAC. De plus les contigs ont été arrangés de manière ordonnée sur des filtres de nitrocellulose. Ainsi, pour déterminer où une portion d'ADN intéressante est située dans le génome, cet ADN est utilisé comme sonde sur les filtres portant les contigs et un signal d'hybridation positif indique la localisation précise de l'ADN (voir la figure 17-14. De tels arrangements des contigs ont reçu le nom de *filtres polytènes* parce qu'ils peuvent être utilisés comme un chromosome polytène pour l'hybridation in situ.

Clonage et séquençage du chromosome humain Y

Les deux plus petits chromosomes humains, les chromosomes 21 et Y, ont été clonés entièrement sous forme de clones chevauchants (contigs) dans des YAC. Par cette méthodologie, une carte de STS à haute résolution a été obtenue, ces sites pouvant servir de repères pour des recherches futures sur ces chromosomes. Nous examinerons le clonage du chromosome Y qui illustre plusieurs techniques que nous avons décrites. La carte des STS a en réalité été otenue par deux méthodes, l'alignement des YAC et l'analyse des délétions.

Alignement des YAC. Les chromosomes humains furent d'abord soumis à un **triage des chromosomes par activation de fluorescence** (**FACS** ou «fluorescence-activated chromosome sorting» en anglais) (figure 17-15).Dans cette technique, les chromosomes en métaphase sont colorés au moyen de deux colorants dont l'un se lie aux régions riches en AT et l'autre aux régions riches en GC. Les cellules sont rompues afin d'obtenir une suspension liquide des chromosomes entiers. La suspension est convertie en un aérosol où la concentration des chromosomes est telle que chaque goutte contient un chromosome. L'aérosol passe dans un faisceau de lumière laser réglé pour exciter la fluorescence. Chaque chromosome produit un signal fluorescent spécifique qui est reconnu électroniquement et deux plaques déflectrices dirigent les gouttes contenant le chromosome spécifique désiré vers un tube collecteur.

Cette technique produisit un échantillon de chromosome Y à partir duquel des clones dans λ furent préparés. Des amorces STS furent construites à partir des clones qui ne contenaient pas d'ADN répétitif. En tout, 160 amorces furent synthétisées. Une banque du chromosome Y dans des YAC comportant 10.368 clones, avec des inserts dont taille moyenne était de 650 kb, fut obtenue. Sur base de ces chiffres, on estima que chaque point du chromosome avait été couvert 4 fois. Les clones dans les YAC furent partagés en 18 pools de 576 YAC qui furent criblés à l'aide des amorces de STS. La subdivision des pools positifs conduisit à l'assignation d'un STS particulier à des YAC spécifiques. Le contenu total en STS de chaque YAC fut établi et les chevauchements entre les YAC déterminés comme dans l'exemple généralisé de la figure 17-15.

Analyse des délétions. Divers types de délétions du chromosomes Y apparaissent naturellement. Certains hommes XX, par exemple, contiennent des fragments tronqués de Y, tandis que certaines femmes XY possèdent des délétions de la région contenant le gène de la masculinité (déterminant les testicules) (voir le chapitre 23). Ces délétions de Y ont été maintenues en cultures de cellules et forment la base de l'alignement des STS du chromosome Y. Chaque délétion a été testée pour le contenu en STS. Etant donné que par nature les délétions s'emboîtaient, le contenu en STS a pu être utilisé non seulement pour établir le carte des STS mais aussi

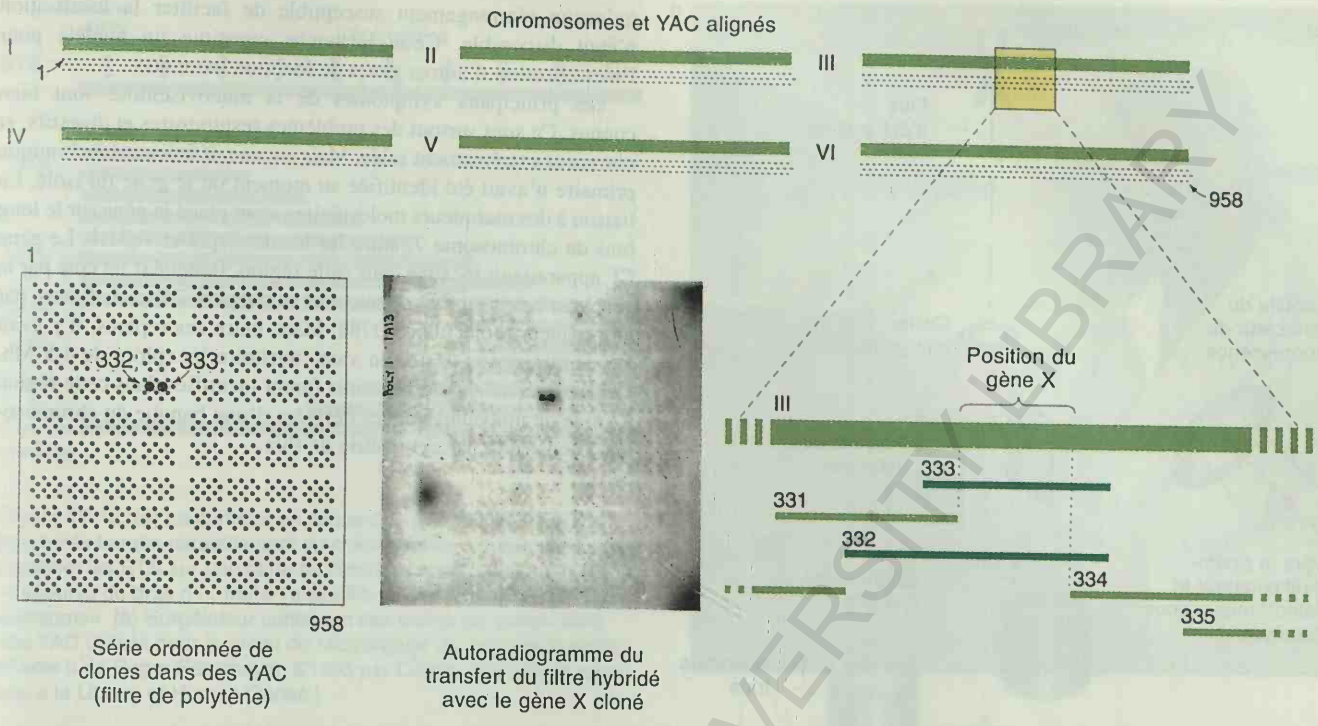


Figure 17-14. L'utilisation d'une série de YAC ordonnés pour déterminer la position d'un nouveau gène cloné chez *Caenorhabditis elegans*. Les YAC sont placés dans l'ordre sur un filtre de polytène. L'ADN de ce filtre est transféré et hybridé avec le gène cloné comme sonde, fournissant l'autoradiogramme avec deux taches positives correspondant aux deux YAC adjacents numérotés 332 et 33. En raison du profil d'hybridation obtenu, la position du gène cloné peut être restreinte à une courte région du chromosome III. (Autoradiogramme d'Alan Coulson.)

pour localiser le recouvrement des délétions. Ce principe est illustré dans la figure 17-16. La carte des STS produite par l'alignement des YAC et la carte obtenue par l'analyse des délétions sont identiques.

Message Les clones peuvent être arrangés en contigs en faisant coïncider des empreintes d'ADN ou de courtes séquences présentes dans les segments clonés, ou en analysant des délétions.

L'analyse génétique au moyen des cartes physiques

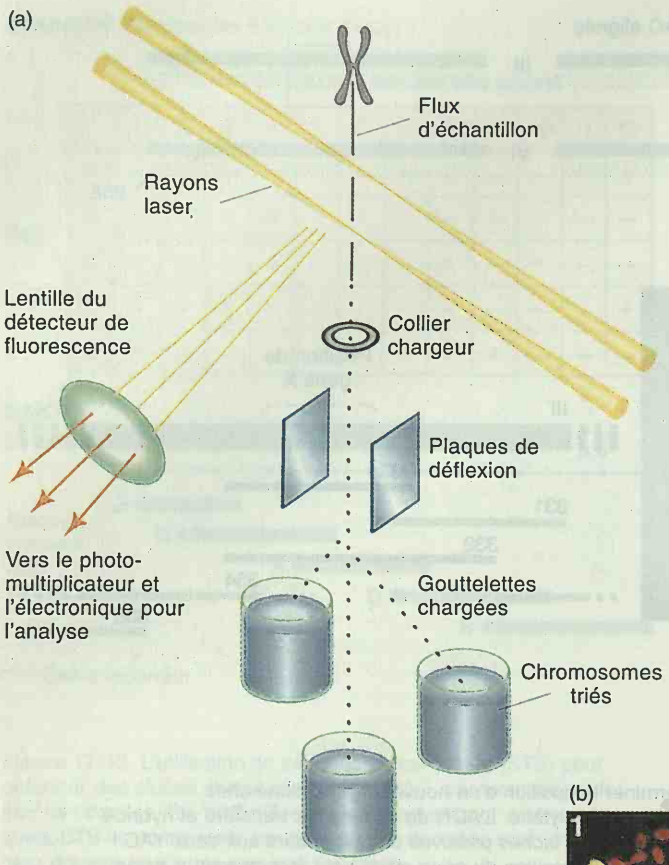
Un carte physique à haute résolution est un élément essentiel pour la poursuite de l'étude génétique d'un organisme. C'est particulièrement vrai dans le cas du clonage par positionnement (voir le chapitre 14) dont le succès dépend totalement de la disponibilité de ce type de carte ou d'autres données de positionnement concernant la région génétique étudiée. Beaucoup de réussites du clonage des gènes de maladies humaines reposent sur le clonage par positionnement. Ceci est lié au fait que, bien qu'en principe un gène puisse être cloné par complémentation de fonction (voir au chapitre 14), la fonction de la plupart des gènes de maladies humaines est ignorée et le clonage par positionnement est dès lors la meilleure solution.

Isolement des gènes de maladies humaines par clonage de positionnement

La figure 17-1 résume la démarche générale du clonage par positionnement des gènes humains. La généalogie et les autres méthodes d'analyse méiotique permettent de préciser à moins d'un centimorgan près la position d'un gène par rapport à un marqueur moléculaire. La cartographie physique et le clonage abaissent encore cette limite. Souvent, un réarrangement cytogénétique tel qu'une délétion (chapitre 8) ou un changement de longueur de fragments de restriction dû à une mutation par répétition de trinucléotides (chapitre 19) apportera des indications importantes en vue d'une localisation précise. En effet, la plupart des clonages par positionnement réalisés jusqu'à présent l'ont été sur base d'informations provenant de réarrangements. Lorsque la recherche aura progressé suffisamment, le gène sera identifié dans la séquence d'ADN par une variété de méthodes y compris l'analyse des transcrits de la région clonée. Enfin, le gène présumé sera séquencé et un mutant construit pour confirmer qu'il s'agit bien du gène recherché.

A titre d'exemple, nous examinerons les méthodes suivies pour identifier la séquence génomique du gène de la mucoviscidose (CF pour cystic fibrosis, en anglais). Affectant environ 1 personne sur 2500, la mucoviscidose est l'une des maladies génétiques les plus répandues. Elle est transmise comme un caractère autosomal récessif. La recherche du gène de cette maladie fut un des premiers tours de force à l'actif du clonage par positionnement et nécessita une collaboration internationale entre plusieurs groupes de recherche. La tâche fut particulièrement difficile étant donné

IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



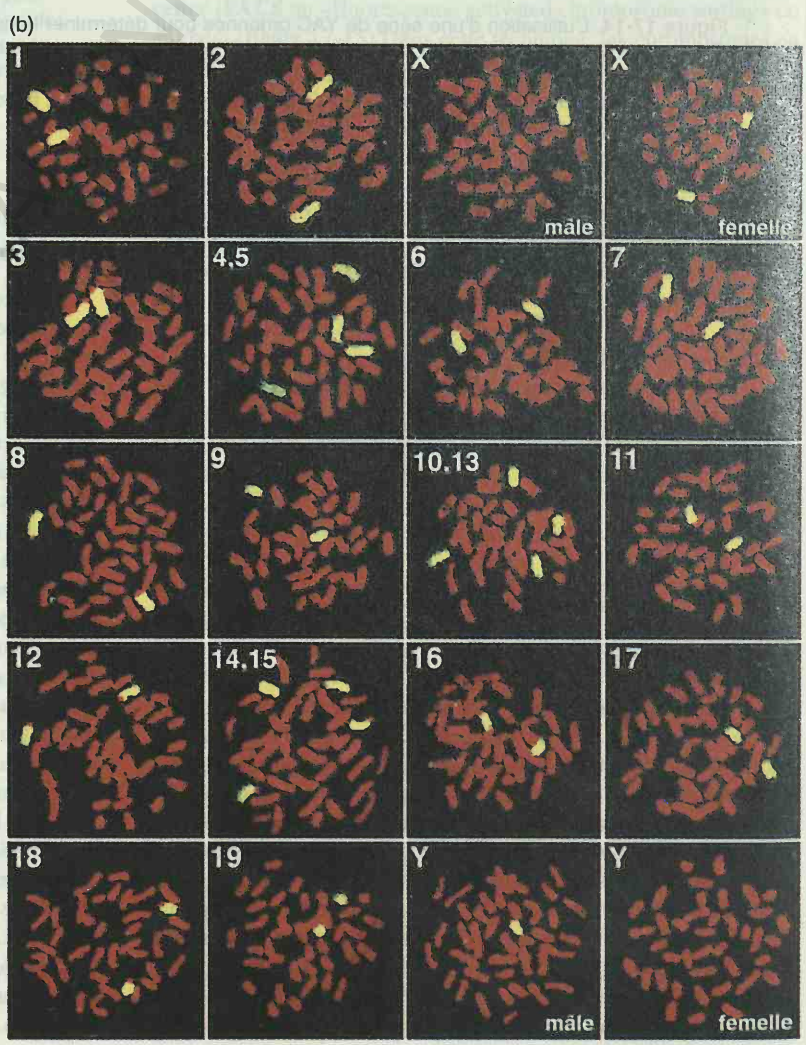


Figure 17-15. (a) Purification des chromosomes au moyen d'un trieur à flux. Les chromosomes colorés avec un colorant fluorescent passent un par un dans un rayon laser. Chaque fois, la fluorescence est mesurée et le chromosome est dévié en conséquence. Les chromosomes sont ensuite récoltés sous forme de gouttelettes. (b) L'utilisation du trieur à flux pour obtenir de l'ADN à utiliser comme sonde pour «peindre» des chromosomes de souris. Les chromosomes peints apparaissent jaunes. Comme plusieurs chromosomes de souris ont la même taille, certaines peintures marquent plus d'un chromosome. Ces études sont utiles pour identifier les chromosomes et étudier les translocations (voir la figure d'entrée du chapitre 8). (Partie a due à l'amabilité du Los Alamos National Laboratory, N.M. Partie b due à l'amabilité de Pamela H. Rabbits, Medical Research Council, Clinical Oncology and Radiotherapeutics Units, Cambridge, England.)

qu'aucun réarrangement susceptible de faciliter la localisation n'était disponible. Cette recherche constitue un modèle pour l'identification d'autres gènes de fonction inconnue.

Les principaux symptômes de la mucoviscidose sont bien connus. Ce sont surtout des problèmes respiratoires et digestifs, et une sueur extrêmement salée. Mais aucune déficience biochimique primaire n'avait été identifiée au moment où le gène fut isolé. La liaison à des marqueurs moléculaires avait placé le gène sur le long bras du chromosome 7, entre les bandes 7q22 et 7q31.1. Le gène CF apparaissait localisé dans cette région, flanqué d'un côté par le gène *met* (un proto-oncogène, voir au chapitre 24) et de l'autre par le marqueur moléculaire D788. Mais, entre ces repères, il y avait 1,5 centimorgans (u.c.), un vaste territoire inexploré de 1,5 Mb. Des marqueurs supplémentaires furent identifiés dans cette région à l'aide de nouvelles sondes dérivées d'une banque du chromosome 7 construite par cytométrie de flux.

BCU IASI

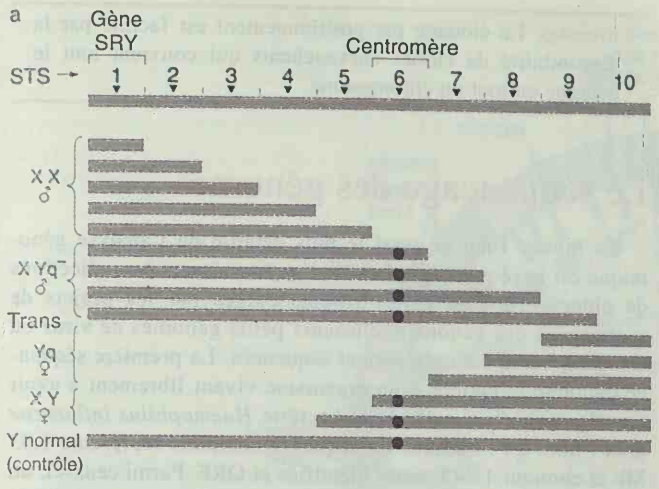


Figure 17-16. (a) Le contenu en séquences marqueurs (STS) de fragments formés naturellement du chromosome Y a été utilisé pour ordonner les STS sur une carte du chromosome Y. Note : *q⁻* signifie «dépourvu du bras q» ; *trans Yq* signifie «translocation d'Yq dans un autosome». (b) Surgélateur contenant des boîtes de clones dans des YAC utilisés pour le projet de séquençage du génome humain. (Partie b de Roger Bessmeyer. ©1995 par Corbis. Tous droits réservés à la Library of Human Genes.)

Néanmoins, les techniques-clés qui furent utilisées pour parcourir cette énorme distance génétique sont la marche sur le chromosome (page 439) et une technique apparentée appelée le **saut sur le chromosome** («chromosome jumping», en anglais). Cette dernière technique fournit le moyen de sauter au-delà de régions d'ADN non clonées et de produire le long de la séquence des repères très espacés qui peuvent ensuite servir de points de départ pour de multiples marches bidirectionnelles sur le chromosome.

Le saut sur le chromosome est illustré dans la figure 17-17. Dans cette méthode, de larges fragments sont produits par restriction partielle de l'ADN de la région présumée contenir le gène d'intérêt. Chaque fragment d'ADN est ensuite circularisé en plaçant ensemble les extrémités du fragment. Cette jonction est coupée et clonée dans un vecteur phagique qui, avec les segments de l'autre jonction, constitue une *banque de saut sur le chromosome*. Une sonde correspondant au début de la région d'ADN étudiée peut servir à cribler la banque pour identifier le clone qui contient le début de la séquence. Une fois trouvée, l'autre extrémité de la séquence de jonction est excisée, utilisée pour cribler à nouveau la banque et faire un deuxième saut. A partir de chaque point de chute, des marches sur le chromosome peuvent être effectuées dans les deux directions à la recherche de séquences ressemblant à des gènes

Une carte de restriction de la région globale fut établie ; elle comportait les sites de restriction d'enzymes à cible rare ainsi que les sites utilisés pour positionner et orienter les séquences obtenues par les sauts et les marches sur le chromosome. Lorsque les parties représentatives de cette région eurent été séquencées, la chasse aux gènes présents le long de ce segment commença. Les gènes furent recherchés par plusieurs méthodes. Premièrement, on savait que les gènes humains sont en général précédés en 5' par des groupes de cytosines et de guanines appelés des îlots *CpG* ; plusieurs furent trouvés ici. Deuxièmement , on fit le raisonnement que, étant donné la conservation des séquences au cours de l'évolution, un gène montrerait une ressemblance avec l'ADN d'autres animaux ; dès lors les séquences des gènes présumés furent utilisées comme sondes pour cribler des transferts de Southern (qu'on appela des «zoo blots») de l'ADN génomique d'un large éventail d'animaux. Troisièmement, des gènes devaient posséder des signaux de départ et d'arrêt appropriés. Quatrièmement, les gènes sont transcrits et des transcrits devaient donc pouvoir être identifiés.

Finalement, un candidat plausible, s'étendant sur 250 kb dans la région, fut trouvé. Puisque les symptômes de la mucoviscidose s'expriment dans les glandes sudoripares, de l'ADNc fut préparé à partir d'une culture de cellules de ces glandes et un ADNc de 6.500 nucléotides, homologue du gène présumé, fut détecté. Après séquençage de l'ADNc normal et de celui de malades atteints de CF, on constata que l'ADNc des malades comportait une délétion de trois paires de bases éliminant une phénylalanine de la protéine. Il était donc très vraisemblable qu'il s'agissait de la séquence codante du gène CF. A partir de cette séquence, une séquence d'acides aminés fut déduite et à partir de celle-ci, la structure tridimensionnelle de la protéine fut prédite. Cette protéine présentait des similitudes structurales avec les protéines du transport des ions dans d'autres systèmes, suggérant qu'une déficience de transport est la cause primaire de la mucoviscidose. Lorsqu'il fut utilisé pour transformer des lignées de cellules de malades souffrant de mucoviscidose, le gène sauvage restaura la fonction normale, apportant la confirmation définitive que la séquence isolée était bien le gène CF.

Avec la progression de la cartographie à haute résolution du génome (montrée plus haut pour le chromosome Y), le clonage par positionnement deviendra beaucoup plus facile que dans le cas du gène CF. Le clonage et le séquençage intensif d'une région révéleront la présence de nouveaux gènes dont les fonctions sont inconnues. Si un gène de maladie est localisé dans cette région, ces séquences deviennent des **gènes candidats** pour cette maladie sans avoir à passer par des sauts et marches sur le chromosome. Cette stratégie est appelée la **démarche du gène candidat** pour l'identi-

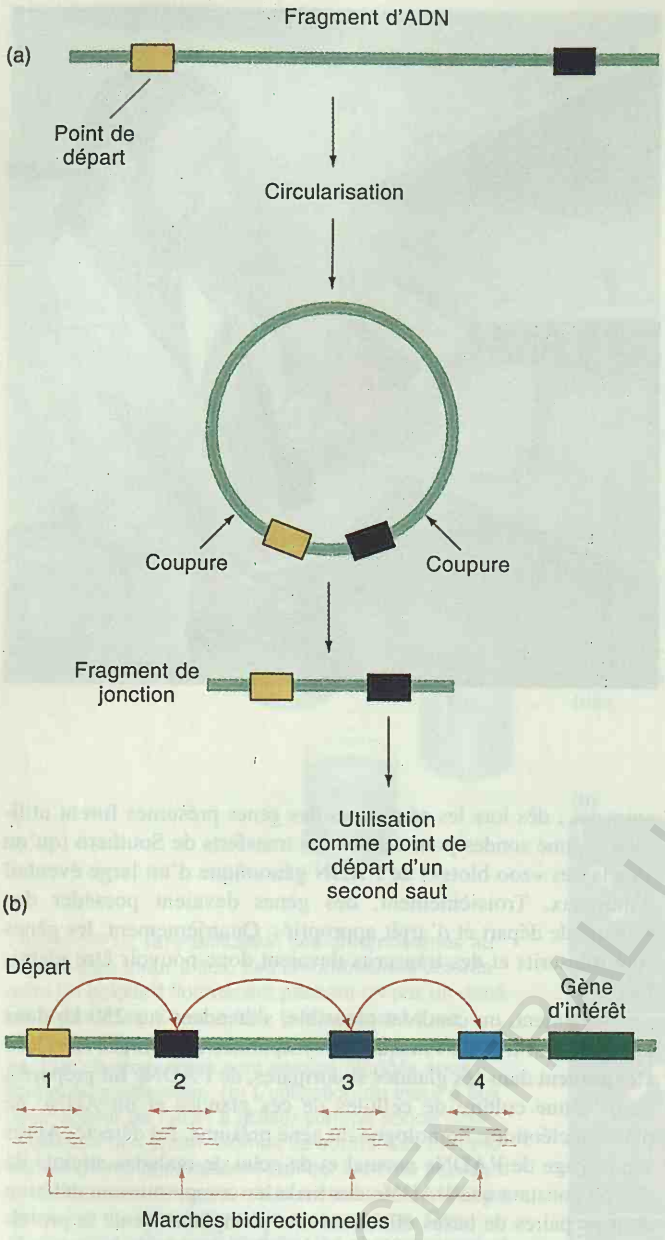


Figure 17-17. Manipulation de fragments génomiques clonés pour des sauts sur le chromosome, un type modifié de marche sur le chromosome qui permet de sauter au delà de régions difficiles à cloner, telles que celles qui contiennent de l'ADN répétitif (voir le texte).

fication des gènes de maladies. Les données qui concernent la déficience biochimique et le profil d'expression tissulaire de la maladie peuvent être comparées aux domaines de la séquence et à l'expression tissulaire du gène candidat. La méthode est également utilisable en sens inverse ; les domaines et l'expression tissulaire de gènes séquencés au hasard suggèrent souvent leur identité avec un gène de maladie.

Message Le clonage par positionnement est facilité par la disponibilité de clones chevauchants qui couvrent tout le génome ou tout un chromosome.

Le séquençage des génomes

Le niveau final et aussi le plus détaillé de l'analyse génomique est le séquençage. Les contigs fournissent les collections de clones ordonnés et les repères exigés par les projets de séquençage des génomes. Plusieurs petits génomes de virus ou d'organites ont été entièrement séquencés. La première séquence génomique entière d'un organisme vivant librement à avoir été déterminée est celle de la bactérie *Haemophilus influenzae* dont l'hôte est l'homme. La séquence complète représente 1,83 Mb et contient 1.743 gènes identifiés et ORF. Parmi ceux-ci, un total de 58 pour cent s'est vu assigner une fonction sur la base de l'étude de mutants obtenus précédemment ou d'analogies avec des gènes présents dans les banques de données génomiques. La séquence entière est présentée dans la figure 17-18, qui comporte un code de couleurs pour les fonctions apparentées (voir la légende). Les génomes de *Mycoplasma genitalium* et *Methanococcus jannaschii*, une archéobactérie, ont été séquencés plus récemment.

Tous les chromosomes de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont été totalement séquencés et c'est le premier organisme eucaryote dont le génome entier a été séquencé. Les gènes du premier chromosome entièrement séquencé, le chromosome 3, sont montrés dans la figure 17-19.

Les retombées potentielles du séquençage des génomes sont énormes. Sur le plan de la recherche fondamentale, la séquence fournit une banque de données qui sert de tremplin pour l'analyse génétique future de cet organisme. Les gènes non assignés sont des gènes en quête de fonction et la génétique inverse permet d'interrompre un gène pour déterminer sa fonction normale selon les règles classiques de la dissection génétique. Dans l'analyse du génome humain, les gènes non assignés peuvent devenir des gènes candidats qui contribuent à causer des maladies humaines. Si la localisation d'un gène responsable d'une maladie vient à être connue, les gènes non assignés présents dans cette région deviennent automatiquement des gènes candidats responsables du phénotype de cette maladie. De plus, les questions posées au sujet du nombre et des types de gènes d'un organisme ont soulevé des points fondamentaux concernant les fonctions qui doivent être codées pour permettre à des organismes de vivre dans une variété de niches écologiques. Il y a aussi, bien sûr, des questions qui concernent l'évolution et la manière dont un organisme a acquis son assortiment de gènes ou se tire d'affaire sans des gènes qui sont absolument indispensables pour d'autres organismes. Un domaine de recherches absolument nouveau s'ouvre donc, celui de l'étude de l'architecture des génomes.

La connaissance de la séquence de l'ADN peut être fructueuse sur le plan commercial. Les compagnies pharmaceutiques, par exemple, ont réalisé l'importance des applications liées à la découverte de nouveaux gènes par séquençage parce que ces gènes peuvent suggérer des cibles moléculaires menant au développement de nouveaux médicaments. Les agronomes reconnaissent qu'il en est de même pour leur discipline et que des gènes peuvent être importants pour l'amélioration des plantes ou

SCU IAS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

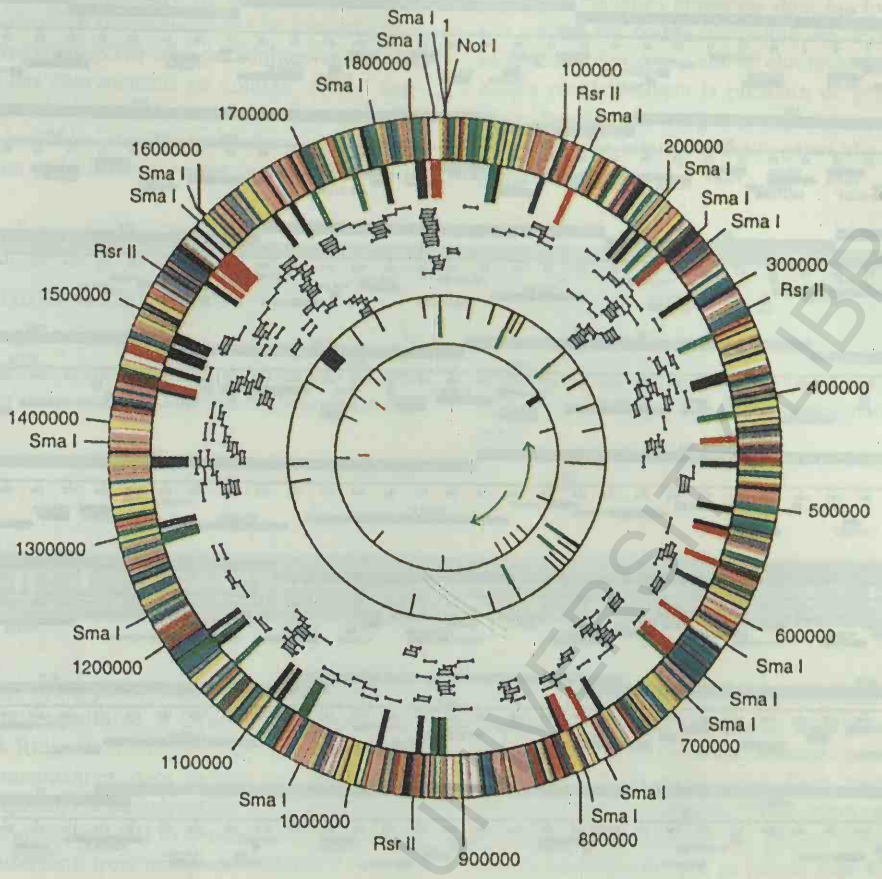


Figure 17-18. L'architecture du génome de la bactérie *Haemophilus influenzae*, basée sur la séquence complète du génome publiée en 1995. Les cercles ont les significations suivantes en commençant par l'extérieur :

- Sites de restriction et leurs positions génomiques, en partant du site *Not*1
- Gènes, avec un code de couleurs basé sur leurs groupes fonctionnels (une clé est montrée dans la figure)
- Régions de contenu élevé en GC : rouge >42%, bleu >40%. Régions de contenu élevé en AT : noir >66%, vert >64%
- Etendue de certains clones utilisés dans le séquençage
- Opérons ribosomiques (vert), ARNt (noir), prophage de type mu (bleu)
- Positions de répétitions en tamdem simples
- Origines de réplication (flèches vertes) et séquences de terminaison (rouge)

(Dessin du Dr. Anthony R. Kerlavage ; Institute for Genomic Research. De *Science*, 1995, 269, 449-604.)

des animaux. Ce ne sont pas seulement des phénotypes liés à un gène unique qui sont recherchés. Beaucoup de maladies héréditaires sont déterminées par l'interaction de plusieurs, voire de nombreux gènes. De plus, beaucoup de phénotypes végétaux ou animaux intéressants sont probablement codés par de tels *polygènes*. La disponibilité de nombreux marqueurs moléculaires le long du génome permet d'envisager, par l'analyse génétique, la recherche et l'identification des interactions entre gènes. Un type d'analyse interdit par la génétique classique est donc réalisable aujourd'hui.

BCU LAUSANNE / CENTRALE UNIVERSITY LIBRARY

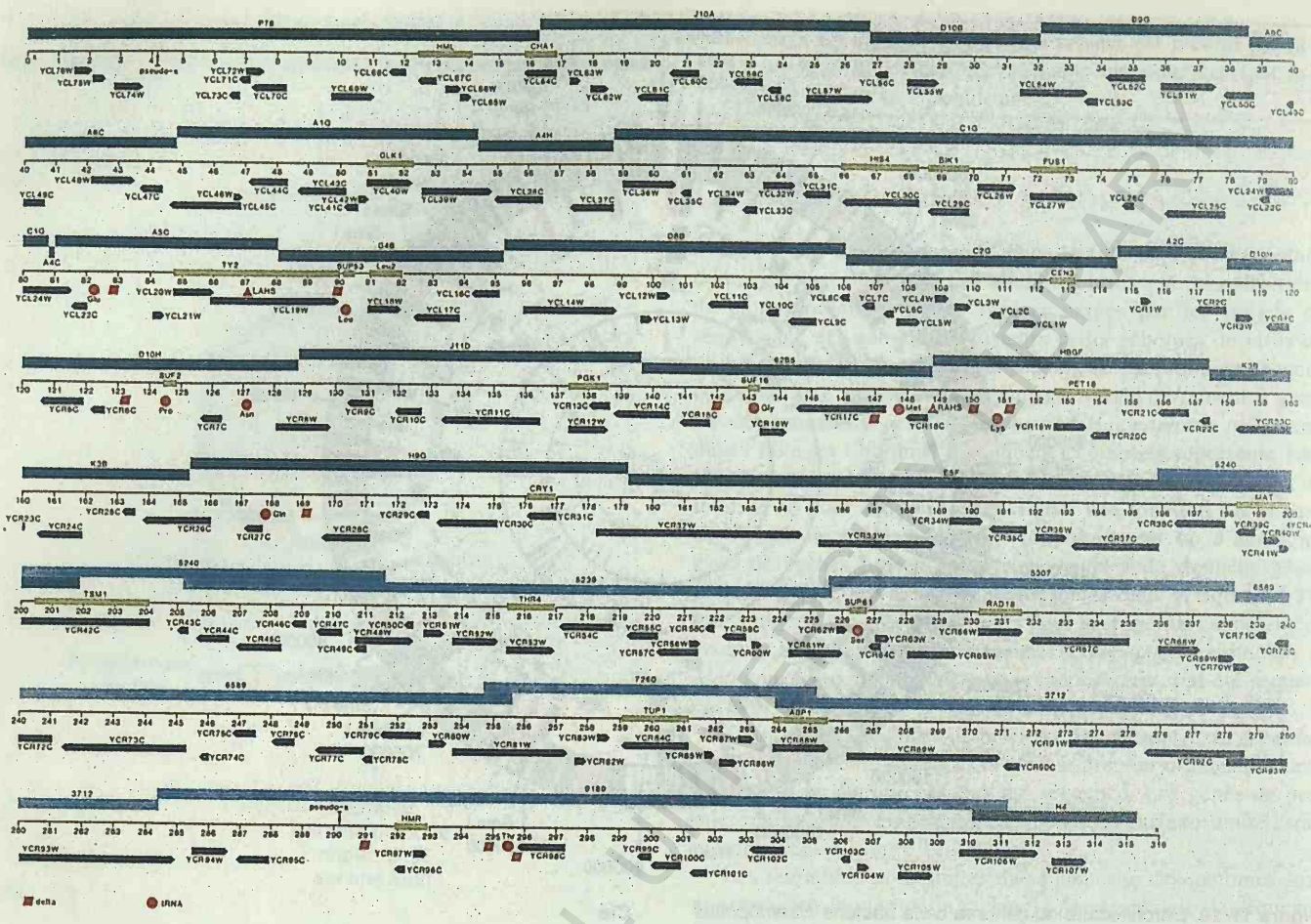


Figure17-19. Le paysage génétique du chromosome 3 de la levure, déterminé par le séquençage du chromosome entier. Les gènes détectés préalablement sur base des phénotypes de mutants sont montrés en jaune. Les cadres de lecture ouverts, qui sont vraisemblablement des gènes codant pour des protéines et furent détectés par l'analyse des séquences, sont montrés sous la ligne, en bleu foncé. Les clones utilisés pour le séquençage sont montrés au dessus de la ligne, en bleu clair. Les séquences Delta sont dérivées du transposon Ty. (S. G. Oliver et al., *Nature* 357, 1992, 38-46.)

RÉSUMÉ

La génomique est la branche de la génétique qui traite de la caractérisation moléculaire systématique des génomes entiers. Certaines des méthodes utilisées sont des procédés classiques de la cartographie génétique mais des techniques supplémentaires ont été développées spécialement pour la manipulation des grandes quantités d'ADN des génomes. L'analyse génomique est importante pour deux raisons : premièrement, elle constitue le moyen d'obtenir une vue d'ensemble de l'architecture génétique d'un organisme et, deuxièmement, elle fournit une information de base utilisable pour identifier de nouveaux gènes comme ceux qui sont impliqués dans les maladies humaines. L'analyse génomique comporte en général une phase initiale dont la résolution est faible et se poursuit par la mise en œuvre de techniques à haute résolution. Dans un premier stade, les gènes doivent être assignés aux chromosomes, ce qui peut se faire par diverses techniques, dont la liaison à des marqueurs standard, l'hybridation in situ, l'électrophorèse sur gel en champs alternés et la construction d'hybrides de cellules humaines et de rongeurs. L'arrangement des loci le long des chromosomes peut être déterminé au moyen de divers types de cartographie par recombinaison méiotique et, pour le génome humain, par l'irradiation des hybrides aux rayons X. Les marqueurs moléculaires, qui permettent de remplir les vides existant entre les gènes appartenant à des associations phénotypiques connues, se sont montrés particulièrement utiles. Les RFLP, les SSLP et les RAPD fournissent tous des loci hétérozygotes qui peuvent servir de marqueurs moléculaires pour la cartographie. Le plus haut niveau de résolution est atteint avec la cartographie physique des fragments d'ADN. Les fragments les plus utiles sont ceux qui ont été clonés dans des vecteurs qui portent de grands inserts d'ADN, comme les cosmides et les YAC. Le but de la car-

tographie physique est la construction d'un ensemble de clones chevauchants qui couvrent tout un chromosome ou tout un génome. Les séquences marqueurs (STS) sont particulièrement utiles pour aligner les cosmides chevauchants en contigs. Avec l'augmentation du nombre de clones caractérisés, les contigs grandissent pour acquérir la taille des chromosomes. Les cartes génomiques ont été utilisées pour le clonage par positionnement de gènes de maladies humaines dont les fonctions sont inconnues. Les cartes ont fourni des points de départ appropriés pour des sauts et des marches sur le chromosome. Le séquençage génomique révèle souvent la présence de gènes qui n'ont jamais été associés à des phénotypes ; ceux-ci doivent alors être identifiés en effectuant des interruptions de gènes afin de vérifier les éventuels phénotypes mutants.

Diagramme conceptuel

Dressez un diagramme conceptuel liant autant des termes suivants que possible. Notez qu'ils ne sont présentés dans aucun ordre particulier.

la génomique / contig / carte physique / YAC / RFLP / SSLP / STS / FISH / fréquence de recombinaison / marqueur moléculaire

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Une généticienne de *Neurospora* vient d'isoler une nouvelle mutation qui confère l'insensibilité à l'aluminium (*al*) à une souche de la lignée Oak Ridge (voir à la page 526). Elle désire cloner le gène par positionnement et, dans ce but, doit le cartographier. Pour des raisons qu'il n'est pas nécessaire de décrire ici, elle soupçonne qu'il est localisé près de l'extrémité du bras droit du chromosome 4. Heureusement, trois marqueurs RFLP (1, 2 et 3) sont disponibles dans ce voisinage et les croisements suivants sont effectués :

al (lignée Oak Ridge) X al^+ (lignée Mauriceville)

Cent descendants sont isolés et testés pour *al* et pour les six allèles de RFLP 1^O, 2^O, 3°, 1^M, 2^M et 3^M. Les résultats sont les suivants, O et M représentant les allèles de RFLP, et *al* et + représentant *al* et al^+ :

RFLP 1	O	M	O	M	O	M
RFLP 2	O	M	M	O	O	M
RFLP 3	O	M	M	O	M	O
locus *al*	*al*	+	*al*	+	*al*	+
Total du génotype	34	36	6	4	12	8

a. Le locus *al* est-il réellement dans ce voisinage ?

b. Si c'est le cas, quel est le RFLP le plus proche ?

c. Combien d'unités cartographiques séparent les trois loci RFLP ?

Solution

Ceci est un problème de localisation mais avec la complication que certains marqueurs sont d'un type traditionnel (que nous avons rencontré dans des chapitres précédent) tandis que d'autres sont des marqueurs moléculaires (dans ce cas-ci des RFLP). Néanmoins, le principe de la localisation est identique à celui utilisé auparavant ; en d'autres mots, elle est basée sur les fréquences de recombinaison. Dans toute analyse de recombinaison, il faut se débarrasser des génotypes des parents avant de partager la descendance en classes de recombinants. Dans ce cas-ci, nous savons que le parent Oak Ridge doit contenir tous les allèles O et les parents Mauriceville tous les allèles M ; les parents étaient donc

al $1^O\ 2^O\ 3^O \times + \ 1^M\ 2^M\ 3^M$

et le fait de savoir ceci rend la détermination des classes de recombinant aisée ; nous voyons d'après les données que les classes parentales sont les plus nombreuses (34 et 36). Nous remarquons d'abord que les allèles *al* sont étroitement liés au RFLP 1 (tous les descendants sont *al* 1^O ou + 1^M). Dès lors, le locus *al* est sûrement situé sur cette partie-ci du chromosome 4. Il y a 6 + 4 = 10 recombinants entre les RFLP 1 et 2 ; donc ces loci doivent être à 10 unités cartographiques l'un de l'autre. Il y a 12 + 8 = 20 recombinants entre les RFLP 2 et 3 ; ils sont distants de 20 unités. Il y a 6 + 4 + 12 + 8 = 30 recombinants entre les RFLP 1 et 3, ce qui montre qu'ils flanquent le RFLP 2. La carte est donc :

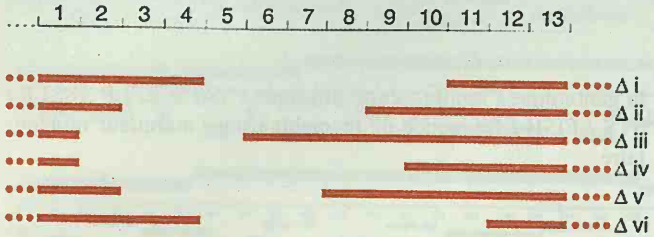
Il n'y a visiblement pas de doubles recombinants puisqu'ils seraient de types MOM ou OMO.

Notez qu'aucun principe nouveau n'est impliqué dans la solution de ce problème ; le véritable défi est de comprendre la nature des RFLP et de les traduire en génotypes dont on peut étudier la recombinaison. Si vous ne voyez pas encore ce que sont les RFLP, vous pourriez vous demander comment les allèles des RFLP sont testés expérimentalement.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PROBLÈME RÉSOLU

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie humaine récessive et liée au chromosome X, qui affecte les muscles. Six jeunes garçons souffraient de DMD en même temps que de diverses autres affections et on constata qu'ils étaient porteurs de courtes délétions du chromosome X, comme montré ci-dessous :



a. Sur base de ces informations , quelle région du chromosome contient le plus vraisemblablement le gène de la DMD ?

b. Pourquoi les garçons montrent-ils d'autres symptômes en plus de ceux de la DMD ?

c. Comment utiliseriez-vous les échantillons d'ADN de ces six garçons et de ceux qui ne sont pas touchés par la maladie pour obtenir, en vue du clonage du gène de la DMD, un échantillon enrichi en ADN contenant ce gène ?

Solution

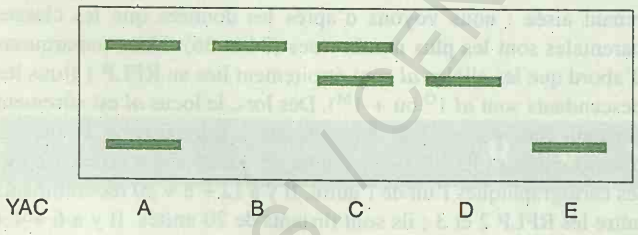
a. La seule région du chromosome qui est éliminée par toutes les délétions est la région marquée 5, qui contient probablement le gène DMD.

b. Les autres symptômes proviennent vraisemblablement de la délétions d'autres régions entourant le gène DMD.

c. Si l'ADN de tous les garçons qui portent une délétion de DMD est dénaturé (c'est-à-dire si ses brins sont séparés) et lié à un filtre, l'ADN normal peut être coupé par cisaillement ou par traitement avec une enzyme de restriction, dénaturé et passé à travers le filtre contenant l'ADN porteur des délétions. La majorité de l'ADN va se lier au filtre et seul l'ADN de la région 5 va passer outre. Cette opération peut être répétée plusieurs fois. L'ADN du filtrat peut être cloné et soumis à la technique d'hybridation in situ (FISH) pour voir s'il se lie à la région DMD des chromosomes X normaux. Si c'est le cas, il devient un candidat pour la séquence du gène DMD.

PROBLÈMES

1. Sur la base d'hybridations in situ, on savait que cinq YAC différents contenant des fragments d'ADN génomiques s'hybrident avec une bande spécifique du génome humain. L'ADN génomique a été digéré avec une enzyme de restriction à cible rare et chacun des YAC marqués radioactivement a été hybridé avec des transferts de Southern des produits de la digestion. L'autoradiogramme obtenu est le suivant :



a. Utilisez ces résultats pour placer dans l'ordre les trois fragments de restriction hybridés.

b. Montrez la localisation des YAC en relation avec les trois fragments de restriction génomiques du point **a.**

Décomposons le problème

a. Citez deux types d'hybridation utilisés en génétique. Quels types d'hybridation sont utilisés dans ce problème et quelle est la base moléculaire de telles hybridations ? (Tracez un croquis montrant ce qui se passe au niveau moléculaire pendant l'hybridation.)

b. Comment sont en général réalisées les hybridations in situ ? Comment serait réalisée l'hybridation impliquée dans ce problème (comme dans la première phrase) ?

c. Qu'est qu'un YAC ?

d. Que sont les bandes des chromosomes et quel procédé utilise-t-on pour les obtenir ? Faites un croquis d'un chromosome avec quelques bandes et montrez à quoi ressemblerait l'hybridation in situ.

e. Comment aurait-on montré que les cinq YAC différents s'hybrident avec une même bande ?

f. Qu'est-ce qu'un fragment génomique ? Vous attendez-vous à ce que les cinq YAC contiennent le même fragment génomique ou des fragments différents ? Comment croyez-vous que ces fragments génomiques ont été produits (quelles sont les méthodes générales pour fragmenter l'ADN). La manière dont l'ADN a été fragmenté a-t-elle de l'importance ?

g. Qu'est-ce qu'une enzyme de restriction ?

h. Qu'est-ce qu'un long-cutter (une enzyme à cible rare) ? Si vous ne savez pas ce que c'est, que croyez-vous que ce puisse être. Votre supposition a-t-elle du sens pour cette partie du problème ? Dans le cas contraire, référez-vous aux discussions concernant ces enzymes dans ce chapitre.

BC HASI / CENTRAL LIBRARY

i. Pourquoi les YAC étaient-ils marqués radioactivement ? (Que signifie marquer quelque chose radioactivement ?)

j. Qu'est-ce qu'un autoradiogramme ?

k. Ecrivez une phrase comportant les mots *ADN*, *digestion*, *enzyme de restriction*, *transfert*, *autoradiogramme*.

l. Expliquez comment le profil de bandes foncées montré dans l'énoncé du problème a été obtenu.

m. Combien de kilobases il y a-t-il environ dans le génome humain ?

n. Si l'ADN du génome humain est digéré par une enzyme de restriction, combien environ de fragments seront obtenus ? Des dizaines ? Des centaines ? Des milliers ? Des dizaines de milliers ? Des centaines de milliers ?

o. Tous ces fragments d'ADN seront-ils différents ? Ou en majorité différents ?

p. Si ces fragments sont séparés sur un gel d'électrophorèse, que verriez-vous si vous ajoutiez un colorant de l'ADN à ce gel ?

q. Comment votre réponse à la question précédente se compare-elle au nombre de bandes d'autoradiogramme dans ce problème ?

r. La partie a du problème mentionne «trois fragments de restriction hybridés»—montrez les sur le diagramme.

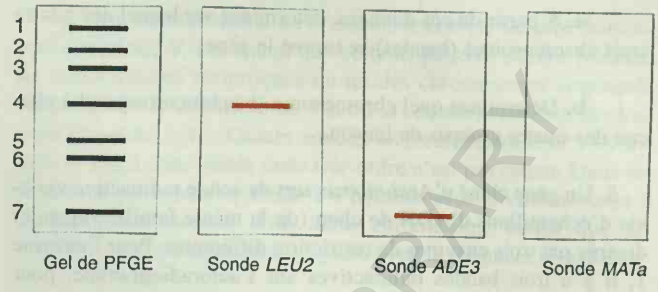
s. Il y a-t-il en réalité des fragments de restriction sur un autoradiogramme ?

t. Quels YAC s'hybrident avec un fragments de restriction et quels YAC s'hybrident avec deux fragments d'ADN ?

u. Comment est-il possible pour un YAC de s'hybrider avec deux fragments d'ADN ? Suggérez deux explications et décidez laquelle a le plus de sens pour cette question. Le fait que que tous les YAC dans cette question se lient à une bande chromosomique (et apparemment à rien d'autre) vous aide-t-il à décider ? Un YAC pourrait-il s'hybrider avec avec plus de deux fragments ?

v. Faites la distinction entre l'utilisation du mot *bande* par les cytogénéticiens (microscopistes des chromosomes) et son utilisation par les généticiens moléculaires. Comment ces deux utilisations se sont -elles retrouvées ensemble dans cette question ?

2. Trois gènes, *LEU2*, *ADE3* et *MATa*, ont été clonés chez la levure. Un généticien de *Neurospora* désirait déterminer si *Neurospora* possèdait ces gènes et, si c'est le cas, cloner leurs équivalents chez *Neurospora*. Comme première étape de cette analyse, il se servit des clones comme sondes radioactives pour hybrider des préparations des chromosomes de *Neurospora* préparées par PFGE ; les résultats sont montrés en haut de la colonne suivante. Quels gènes sont présents chez *Neurospora* et sur quels chromosomes sont-ils localisés ?



3. Un généticien de *Neurospora* désirait cloner le gène *cys-1* que l'on croyait localisé près du centromère, sur le chromosome 5. Deux marqueurs RFLP (RFLP1 et RFLP2) étaient disponibles dans ce voisinage et il fit le croisement

cys-1 (lignée Oak Ridge) × *cys-1*$^+$ (lignée Mauriceville)

100 ascospores furent ensuite testés pour les génotypes RFLP et *cys-1*. Les résultats furent

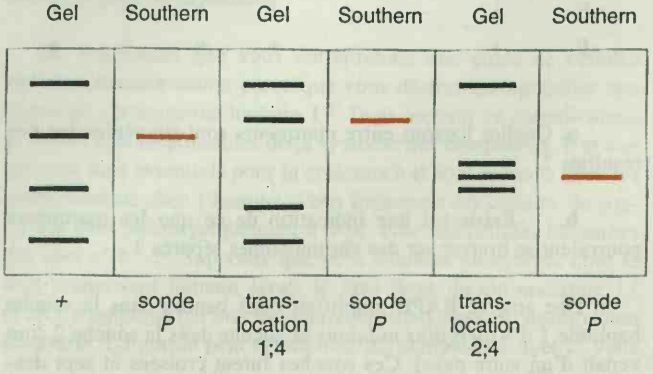
RFLP1	O	M	O	M	O	M
RFLP2	O	M	M	O	M	O
Locus *cys*	*cys*	+	+	*cys*	*cys*	+
Total du génotype	40	43	2	3	7	5

a. Le locus *cys-1* est-il dans cette région du chromosome ?

b. Dans l'affirmative, dressez une carte des loci dans cette région et indiquez-y les unités cartographiques.

c. Quelle serait l'étape suivante dans le clonage du gène *cys-1* ?

4. Un certain champignon a été soumis à une analyse génétique intensive et quatre groupes de liaison ont été déterminés, suggérant l'existence de quatre chromosomes. Toutefois, ces chromosomes étaient très petits et difficiles à voir au microscope, et on ne savait pas s'il y avait réellement quatre chromosomes. Le développement de la technologie de la PFGE montra qu'il y avait quatre chromosomes. Mais les groupes de liaison devaient encore être assignés à ces chromosomes. Dans ce but, un gène *P* cloné fut utilisé dans une analyse de Southern avec des préparations de PFGE d'une souche sauvage et de deux souches portant des translocations qui, sur base d'études génétiques, affectaient les groupes de liaison 1 et 4 dans un cas, et 2 et 4 dans l'autre. Les résultats sont les suivants :



BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a. A partir de ces données, déterminez sur lequel des quatre vrais chromosomes (bandes) se trouve le gène.

b. Déterminez quel chromosome (bande) correspond à chacun des quatre groupes de liaison.

5. Un gène cloné d'*Arabidopsis* sert de sonde radioactive vis-à-vis d'échantillons d'ADN de chou (de la même famille végétale) digérés par trois enzymes de restriction différentes. Pour l'enzyme 1, il y a trois bandes radioactives sur l'autoradiogramme, pour l'enzyme 2 il y a une bande et pour l'enzyme 3 il y a trois bandes. Comment ces résultats peuvent ils s'expliquer ?

6. Cinq clones d'ADN humain dans des YAC (YAC-A à YAC-E) ont été testés pour les séquences marqueurs STS1 à STS7. Les résultats sont montrés dans le tableau suivant où un «+» indique que le YAC contient le STS correspondant.

	STS						
YAC	1	2	3	4	5	6	7
A	+	–	+	+	–	–	–
B	+	–	–	–	+	–	–
C	–	–	+	+	–	–	+
D	–	+	–	–	+	+	–
E	–	–	+	–	–	–	+

a. Tracez une carte physique montrant l'ordre des STS.

b. Alignez les YAC en un contig.

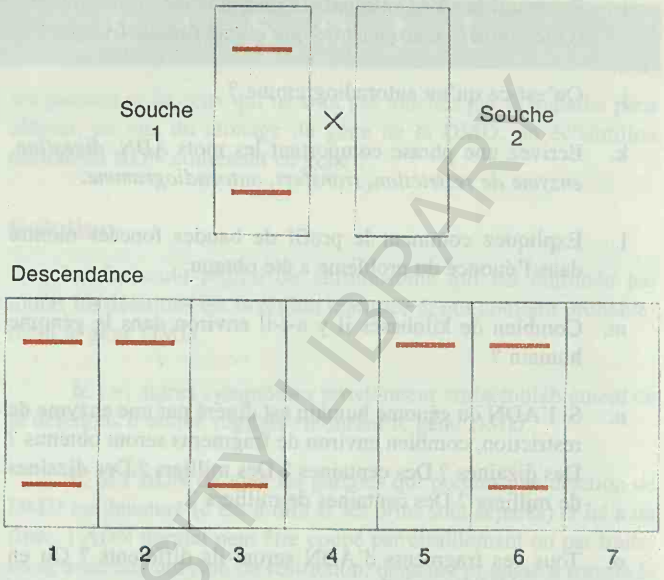
7. Sept hybrides irradiés homme-rongeur ont été obtenus et testés pour six marqueurs moléculaires différents du génome humain, A à F. Les résultats sont montrés dans le tableau ci-dessous où «+» indique la présence du marqueur.

	Hybrides irradiés						
Marqueurs	1	2	3	4	5	6	7
A	–	+	–	–	+	+	–
B	+	–	+	–	–	–	–
C	+	–	+	+	–	+	–
D	–	+	–	+	+	+	–
E	+	–	–	+	+	–	+
F	+	–	–	+	+	–	+

a. Quelles liaisons entre marqueurs sont suggérées par ces résultats ?

b. Existe-t-il une indication de ce que les marqueurs pourraient se trouver sur des chromosomes séparés ?

8. Une amorce RAPD amplifiait deux bandes dans la souche haploïde 1 d'*Aspergillus nidulans* et aucune dans la souche 2 (qui venait d'un autre pays). Ces souches furent croisées et sept descendants furent analysés. Les résultats furent les suivants :

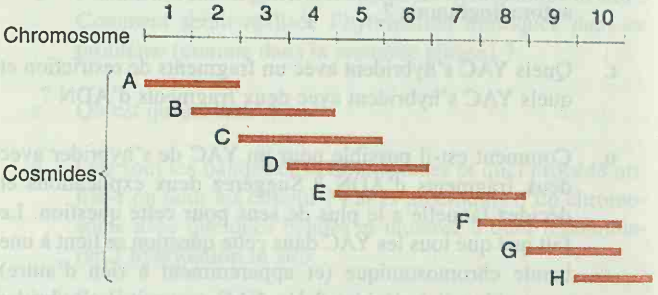


a. Tracez un diagramme qui explique les différences entre les souches parentales.

b. Expliquez l'origine des descendants et de leurs fréqences relatives.

c. Comment se présenterait une tétrade ditype parentale par rapport à ce type particulier d'amplification ?

9. Un contig pour une région du chromosome 2 de *Caenorhabditis* se présente de la façon suivante, A à H étant des cosmides :



a. Un gène cloné, pBR322-*x* s'hybridait avec les cosmides C, D et E. Quelle est la localisation approximative de ce gène x sur le chromosome ?

b. Un gène cloné, pUC18-*y*, ne s'hybride qu'avec les cosmides E et F. Quelle est sa localisation ?

c. Expliquez exactement comment il est possible que les deux sondes s'hybrident avec le cosmide E ?

10. Un généticien réussit à maintenir trois colonies d'hybrides de cellules humaines et de souris. Les seuls chromosomes humains conservés par les cellules hybrides sont ceux indiqués «+» ci-dessous :

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Colonie hybride	Chromosome humain 1	2	3	4	5	6	7	8
A	+	+	+	+	–	–	–	–
B	+	+	–	–	+	+	–	–
C	+	–	+	–	+	–	+	–

Le généticien teste chacune des colonies pour la présence de cinq enzymes (α, β, γ, δ, et ε) avec les résultats suivants : α n'est active que dans la colonie C, β est active dans les trois colonies, γ n'est active que dans les colonies B et C, δ est active seulement dans la colonie B et ε ne montre d'activité dans aucune colonie. Que peut conclure le généticien en ce qui concerne les localisations des gènes responsables de ces activités enzymatiques ?

11. Considérez l'ensemble suivant de huit lignées cellulaires hybrides homme-souris :

Lignée cellulaire	Chromosome humain 1	2	6	9	12	13	17	21	X
A	+	+	–	q	–	p	+	+	+
B	+	–	p	+	–	+	+	–	–
C	–	+	+	+	p	–	+	–	+
D	+	+	–	+	+	–	q	–	+
E	p	–	+	–	q	–	+	+	q
F	–	p	–	–	q	–	+	+	p
G	q	+	–	+	+	+	+	–	–
H	+	q	+	–	–	q	+	–	+

Chaque lignée cellulaire peut contenir un chromosome (numéroté) intact (+), uniquement son bras long (q), uniquement son bras court (p) ou être privé du chromosome (–). Les enzymes humaines suivantes furent testées pour leur présence (+) ou absence (–) dans les lignées cellulaires A à H :

Enzyme	Lignée cellulaire A	B	C	D	E	F	G	H
Stéroïde sulfatase	+	–	+	+	–	+	–	+
Phosphoglucomutase -3	–	–	+	–	+	–	–	+
Estérase D	–	+	–	–	–	–	+	+
Phosphofructokinase	+	–	–	–	+	+	–	–
Amylase	+	+	–	+	+	–	–	+
Galactokinase	+	+	+	+	+	+	+	+

Identifiez le chromosome qui porte le gène codant pour chacune des enzymes. Si possible, identifiez le bras du chromosome.

(Problème 11 de L. A. Snyder, D. Freifelder et D. L. Hartl, *General Genetics*. Jones and Bartlett, 1985.)

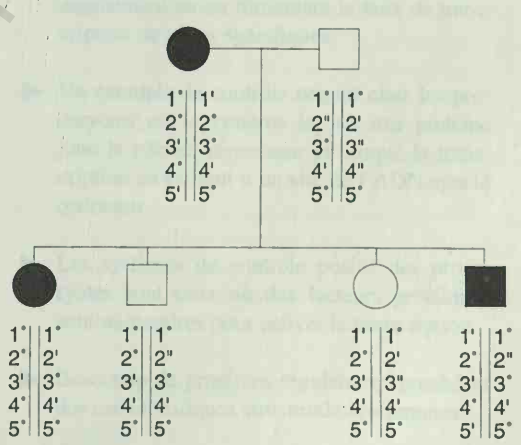
12. Une certaine maladie est transmise comme un gène autosomal dominant, *N*. On a noté que certains patients étaient porteurs de translocations réciproques où un des chromosomes impliqués était toujours le chromosome 3 et où la cassure avait toujours lieu dans la bande 3q3.1. Quatre sondes moléculaires (a à d) s'hybrident in situ à cette bande mais leur ordre n'est pas connu. Dans les translocations, seule la sonde c s'hybride avec le chromosome 3 porteur d'une portion d'un autre chromosome tandis que les sondes a, b et d s'hybrident toujours avec le fragment transloqué.

a. Tracez un diagramme qui illustre le sens de ces observations.

b. Comment utiliseriez-vous cette information pour cloner l'allèle normal *n* par positionnement ?

c. Lorsque *n* sera cloné, comment pourrez-vous utiliser ce clone pour étudier la nature des mutations des patients qui n'ont pas de translocation ?

13. On croit que le gène de la maladie autosomale dominante montrée dans la généalogie ci-dessous est localisé sur le chromosome 4 ; c'est pourquoi cinq RFLP (1 à 5) furent testés chez tous les membres de la famille. Les résultats sont également montrés sur le diagramme ; les exposants représentent des allèles différents des loci RFLP.



a. Expliquez comment cette expérience a été réalisée.

b. Décidez quel RFLP est le plus proche du gène de la maladie (Expliquez votre raisonnement).

c. Comment vous serviriez-vous de cette information pour cloner le gène de la maladie ?

14. Supposons que vous entrepreniez une étude de cellules hybrides homme-souris parce que vous désirez cartographier une partie du chromosome humain 17. Trois loci sur ce chromosome, *a*, *b* et *c*, sont responsables de la synthèse des composés a, b et c— qui sont tous essentiels pour la croissance et sont présents chez les souris comme chez l'homme. Vous fusionnez des cellules de souris qui sont phénotypiquement a^- b^- c^- avec des cellules humaines qui sont a^+ b^+ c^+. Supposez que vous trouviez un hybride dont le seul composant humain serait le bras droit du chromosome 17 (17R), transloqué par un mécanisme inconnu dans un chromosome de souris. L'hybride peut synthétiser les composés a, b et c. Vous

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

traitez ensuite les cellules avec un adénovirus qui provoque des cassures dans le chromosome. Supposez que vous pouvez isoler 200 lignées dont des morceaux du 17R transloqué ont été arrachés. Vous testez la capacité de ces lignées à synthétiser a, b et c et obtenez les résultats suivants :

Nombre	Peut synthétiser
0	a seul
0	b seul
12	c seul
0	a et b seuls
80	b et c seuls
0	a et c seuls
60	a, b et c
48	rien

a. Comment ces différents types sont-ils apparus ?

b. Les gènes a, b et c sont-ils localisés sur le bras droit du chromosome 17 ? Si oui, dressez une carte montrant leurs positions relatives.

c. Comment les profils de bandes pourraient-ils vous aider dans votre analyse ?

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

18

La régulation de l'expression des gènes

Vue du complexe répresseur *lac*-ADN basée sur la cristallographie aux rayons X. La liaison du répresseur tétramérique à deux opérateurs est montrée. Chaque dimère se lie à un opérateur. Les opérateurs comportent 21 paires de bases et sont montrés en bleu clair et bleu foncé. Les monomères du répresseur sont représentés en vert, violet, rouge et jaune. Voyez comment la région aminoterminale d'un monomère (violet) enjambe l'autre monomère (vert) pour se lier à la première partie de l'opérateur tandis que la région aminoterminale du second monomère (vert) croise le premier pour se lier à l'autre partie de l'opérateur. Ainsi, les hélices de reconnaissance des deux sous-unités se lient à des régions consécutives du même opérateur. (Figure fournie par M. Lewis, Geoffrey Chang, M. A. Kercher, H. C. Pace, M. A. Schumacher, R. G. Brennan et P. Lu, Université de Pennsylvanie).

CONCEPTS-CLÉS

- La régulation de l'expression des gènes est le plus souvent exercée par des protéines qui réagissent à des signaux de l'environnement en augmentant ou en diminuant le taux de transcription de gènes spécifiques.
- Un exemple de contrôle négatif chez les procaryotes est le système lac où une protéine joue le rôle de répresseur et bloque la transcription en se liant à un site de l'ADN appelé opérateur.
- Les systèmes de contrôle positif des procaryotes sont ceux où des facteurs protéiques sont nécessaires pour activer la transcription.
- Beaucoup de protéines régulatrices possèdent des caractéristiques structurales communes.
- Chez les eucaryotes aussi, le contrôle transcriptionnel est exercé par des facteurs protéiques qui agissent en trans en se liant à des séquences régulatrices spécifiques.
- Des sites supplémentaires de l'ADN, appelés amplificateurs (enhancers), modulent l'expression des gènes eucaryotiques en interagissant avec des protéines régulatrices spécifiques.

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

Jusqu'à présent, nous avons discuté de la nature des gènes et de la manière dont se produisent et sont transmis les changements génétiques. Nous avons aussi, au chapitre 13, vu comment les gènes s'expriment en étant transcrits en molécules d'ARN dont beaucoup sont traduites en protéines. Mais comment la cellule *régule*-t-elle l'expression de tous ces gènes ? Il est évident que le contrôle de l'expression des gènes est essentiel pour un organisme. Chez les organismes supérieurs, les cellules spécifiques se différencient au point de devenir hautement spécialisées. Une cellule de l'œil humain synthétise les protéines importantes pour la couleur de l'œil mais ne produit pas les enzymes de détoxication qui sont présentes dans les cellules hépatiques. Chaque cellule s'arrange donc pour n'exprimer que certains de ses gènes.

Les bactéries aussi ont besoin de réguler l'expression de leurs gènes. Les enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres en fournissent un exemple. Les enzymes cataboliques sont nécessaires pour dégrader diverses sources de carbone en vue de produire de l'énergie. Mais de nombreux composés peuvent servir de sources de carbone pour les bactéries, notamment des sucres comme le lactose, le glucose, le maltose, le rhamnose, le raffinose, le mélibiose, le galactose, et le xylose. Diverses enzymes se chargent de transporter chacun de ces composés dans la cellule et de catalyser les différentes étapes de leur dégradation. Si une cellule devait synthétiser simultanément toutes les enzymes dont elle pourrait potentiellement avoir besoin, cela lui coûterait beaucoup plus d'énergie qu'elle ne pourrait en tirer de la dégradation d'une quelconque source de carbone qui pourrait être mise à sa disposition. C'est pourquoi la cellule a développé des mécanismes qui lui permettent de réprimer les gènes qui codent pour des enzymes inutiles et de les activer au moment où ils deviennent nécessaires. Pour réaliser ceci, deux conditions doivent être remplies :

1. La cellule doit posséder le moyen de mettre en route ou d'arrêter l'expression de chaque gène ou de chaque groupe de gènes particulier.

2. Elle doit en outre être capable de reconnaître les situations où il devient nécessaire d'activer ce gène ou ce groupe de gènes.

Décrivons tout d'abord le modèle qui rend compte de la régulation de l'expression des gènes. Ensuite nous verrons comment il a été élaboré.

Les circuits régulateurs de base

Le premier système auquel nous nous intéresserons est celui du métabolisme du lactose chez *Escherichia coli*. On possède à l'heure actuelle énormément de renseignements quant au fonctionnement de ce système. La figure 18-1 montre un modèle physique couramment accepté pour le contrôle de la synthèse des protéines du système lactose.

Le métabolisme du lactose exige deux protéines : une perméase pour son transport dans la cellule et la β-galactosidase pour son clivage en glucose et galactose. La perméase et la β-galactosidase sont codées par des gènes adjacents, *Z* et *Y*. Un troisième gène, *A*, spécifie une enzyme supplémentaire, appelée *transacétylase*, qui n'est pas nécessaire pour le métabolisme du lactose, et dont nous ne parlerons pas pour le moment. Les trois gènes sont transcrits en une molécule d'ARN messager (ARNm) unique ou **polycistronique**. Ainsi, il est possible, par la modulation de la synthèse d'un seul ARNm, de coordonner la régulation de la production des trois enzymes. Un quatrième gène, le gène *I*, localisé à proximité mais pas exactement adjacent aux gènes *Z*, *Y* et *A*, code pour une protéine qu'on appelle le **répresseur** parce qu'elle bloque l'expression des gènes *Z*, *Y* et *A*. Le répresseur se lie à une région de l'ADN proche du début du gène *Z* et du point où commence la transcription de l'ARNm polycistronique. Le site de l'ADN auquel se lie le répresseur est appelé l'**opérateur**. La propriété essentielle du répresseur est donc de reconnaître la courte séquence spécifique d'ADN qui constitue cet opérateur.

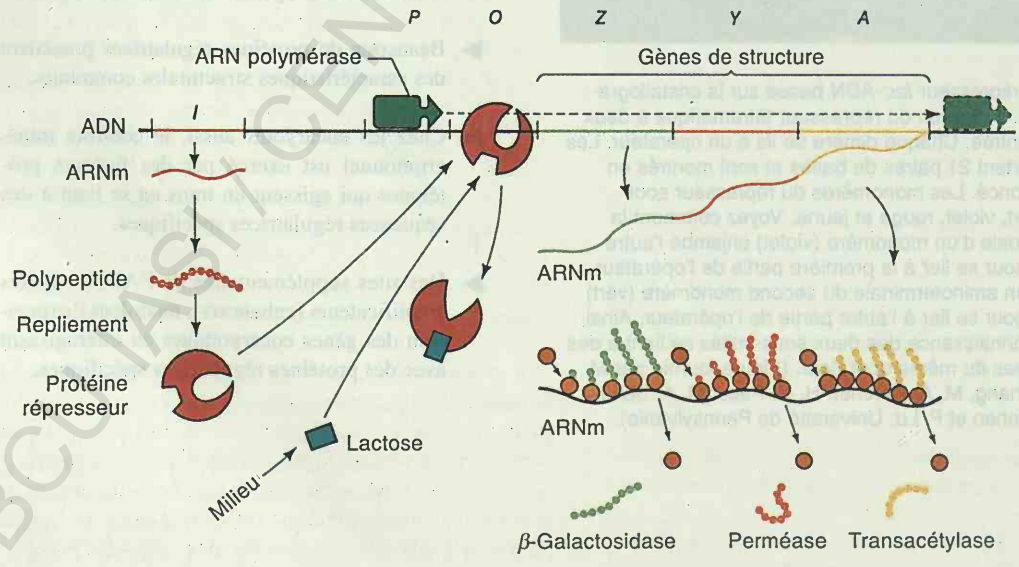


Figure 18-1. La régulation de l'opéron *lactose*. Le gène *I* synthétise le répresseur en permanence. Celui-ci interagit avec la région *O* (opérateur) et empêche l'ARN polymérase liée à *P* de transcrire les gènes structuraux adjacents. Lorsque le lactose est présent, il se lie au répresseur qui change de conformation et ne peut plus s'attacher à *O*. L'ARN polymérase est alors capable de transcrire les gènes de structure *Z*, *Y* et *A*, de telle sorte que les trois protéines soient produites.

BCU LAUSANNE / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

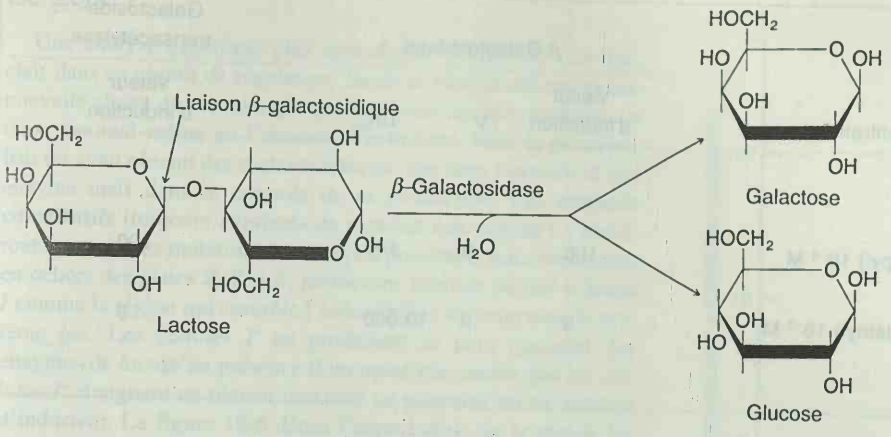


Figure 18-2. Le métabolisme du lactose. L'enzyme β-galactosidase catalyse une réaction dans laquelle une molécule d'eau est ajoutée au lien β-galactosidique pour cliver le lactose en des molécules de galactose et de glucose. La lactose perméase est nécessaire pour le transport du lactose dans la cellule.

C'est ce qui assure la fixation du répresseur à un site de l'ADN qui est proche des gènes qu'il contrôle et non à d'autres sites quelconques du chromosome. En se liant à l'opérateur, le répresseur empêche l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase. Normalement, l'ARN polymérase se lie à des régions particulières de l'ADN situées au début des gènes ou des groupes de gènes et appelées **promoteurs** (voir le chapitre 13) de manière à commencer la transcription aux sites d'initiation corrects. Le segment *POZYA* montré dans la figure 18-1 constitue un **opéron**, c'est-à-dire une unité génétique d'expression coordonnée.

Le répresseur de *lac* est une molécule à deux sites de reconnaissance, l'un pour la séquence spécifique de l'opérateur du système *lac*, l'autre pour le lactose et certains de ses analogues. Lorsque le répresseur lie des dérivés du lactose, il subit un changement de conformation ; cette altération minime de la forme du répresseur modifie son site de liaison à l'opérateur de telle manière qu'il perde son affinité pour celui-ci. Ainsi, en réponse à la liaison des dérivés du lactose, le répresseur se détache de l'ADN. La deuxième condition exigée d'un système de régulation est donc remplie avec l'aptitude à déceler les circonstances où il est utile d'activer l'expression des gènes *lac*. La levée de la répression pour des systèmes comme *lac* est appelée **induction ;** les dérivés du lactose qui inactivent le répresseur et provoquent l'expression des gènes *lac* sont dénommés **inducteurs.**

D'autres systèmes bactériens utilisent des protéines qui jouent le rôle d'«activateurs» dont la fixation à l'ADN est indispensable pour la transcription. D'autres mécanismes encore exigent des protéines qui assurent la continuation de la transcription en réponse à certains signaux intracellulaires. Avant d'examiner en détail certains de ces circuits de contrôle, passons en revue les travaux aujourd'hui classiques qui conduisirent à la description des systèmes de régulation bactériens, puisque ces études font époque dans l'histoire des conquêtes de l'analyse génétique.

La découverte du système *lac* : un contrôle négatif

Une percée majeure dans la compréhension du contrôle de l'expression des gènes fut réalisée dans les années 1950 avec l'analyse détaillée par François Jacob et Jacques Monod des enzymes impliquées dans le métabolisme du lactose chez *E. coli* et dans l'immunité chez le phage λ. Jacob et Monod utilisèrent le système métabolique du lactose d'*E. coli* (voir figure 18-2) pour aborder le problème de l'**induction** enzymatique (appelée *adaptation* à l'origine) — c'est-à-dire le fait qu'une enzyme spécifique n'apparaisse qu'en présence de ses substrats. Ce phénomène avait été observé chez les bactéries depuis plusieurs années. Comment une cellule pouvait-elle «savoir» exactement quelles enzymes synthétiser ? Comment un substrat déterminé pouvait-il induire l'apparition d'une enzyme spécifique ?

Dans le cas du système *lac*, ce phénomène d'induction était illustré par le fait qu'en présence de certains galactosides appelés *inducteurs*, les cellules produisaient 1.000 fois plus de β-galactosidase, une enzyme qui clive les β-galactosides, qu'elles n'en produisaient lorsqu'elles étaient cultivées en l'absence de ces sucres. Quel rôle jouait l'inducteur dans ce phénomène ? Une possibilité était qu'il agît simplement en activant une pré-galactosidase, un intermédiaire préalablement accumulé dans la cellule. Néanmoins, en suivant le sort d'acides aminés radioactifs ajoutés à des cellules en croissance soit avant, soit après l'addition de l'inducteur, Jacob et Monod purent montrer que l'induction correspond à la synthèse de nouvelles molécules d'enzymes. Des études cinétiques établirent que ces molécules étaient déjà décelables trois minutes après l'addition d'un inducteur ! De plus, le retrait de cet inducteur provoquait un arrêt brutal de la synthèse de la nouvelle enzyme. Il devint clair, dès lors, que la cellule possédait un mécanisme qui lui permettait de déclencher ou d'arrêter l'expression d'un gène en réponse aux signaux de l'environnement. Quel pouvait être ce mécanisme ?

Jacob et Monod cherchaient à établir une relation entre le centre catalytique de l'enzyme induite et la structure moléculaire de l'inducteur. L'idée la plus répandue à cette époque était que l'inducteur (une petite molécule de β-galactoside) pouvait diriger la formation du site actif de l'enzyme en jouant en quelque sorte le rôle d'un moule. Ils constatèrent que, si seuls les β-galactosides pouvaient servir d'inducteurs, il n'existait cependant aucune corrélation entre la capacité inductrice d'un composé et son affinité pour la β-galactosidase. La figure 18-3 montre quelques-unes des données qu'ils obtinrent. Voyez par exemple l'affinité élevée de la β-galactosidase pour le phényléthylgalactoside qui est pourtant un mauvais inducteur. De bons inducteurs, comme l'isopropyl—D-thiogalactoside (IPTG ; voir la figure 18-4), un β-galactoside de synthèse, ne sont même pas des substrats de l'enzyme. La différence entre les stéréospécificités d'induction de la β-galactosidase et de liaison à celle-ci indique que l'élément impliqué dans la régulation de la synthèse de la β-galactosidase est distinct de la β-galactosidase elle-même.

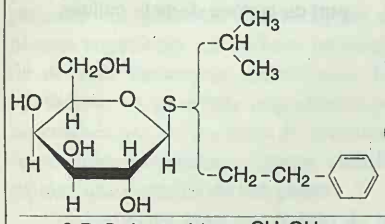
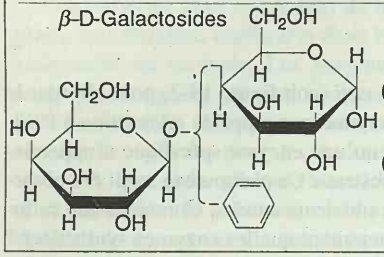
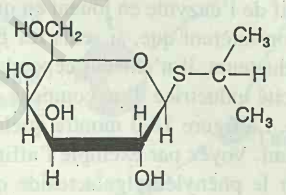
Composé	Concentrations	β-Galactosidase			Galactoside-transacétylase
		Valeur d'induction	*V*	$1/K_m$	Valeur d'induction
β-D-Thiogalactosides					
	(isopropyl) 10^{-4} M	100	0	140	100
	(phényléthyl) 10^{-3} M	5	0	10 000	3
β-D-Galactosides					
	(lactose) 10^{-3} M	17	30	14	12
	(phényl) 10^{-3} M	15	100	100	11

Figure 18-3. Induction de la β-galactosidase et de la β-galactoside transcétylase par divers galactosides. Les données sont extraites directement de l'article original de Jacob et Monod de 1961. Les valeurs d'induction représentent les activités spécifiques de chaque enzyme en pour cent de la valeur d'induction maximale. La colonne des V se rapporte à l'activité maximale de la β-galactosidase vis-à-vis de chaque substrat. La colonne $1/K_m$ exprime l'affinité de la β-galactosidase pour chaque substrat. Ces deux valeurs sont données en pour cent des valeurs obtenues pour le phénylgalactoside pris comme composé de référence. (De F. Jacob et J. Monod, *Journal of Molecular Biology* 3, 1961, 318.)

Gènes contrôlés de manière concertée

Jacob et Monod avaient constaté que la perméase, qui est nécessaire pour le transport du lactose dans la cellule, était induite en même temps que la β-galactosidase. L'analyse de mutants établit que chacune de ces protéines était codée par un gène différent. La transacétylase (qui n'est pas indispensable et dont la fonction n'est pas connue) fut également caractérisée et on montra qu'elle était codée par un gène distinct, bien qu'induite en même temps que la β-galactosidase et la perméase. (Voir la colonne de droite dans la figure 18-3). Jacob et Monod avaient donc identifié **trois gènes contrôlés de manière coordonnée** : le gène *Z* codant pour la β-galactosidase, le gène *Y* codant pour la perméase et le gène *A* codant pour la transacétylase. La cartographie établit que ces trois gènes étaient étroitement liés sur le chromosome. L'étude du système *lac* ainsi que celle d'autres gènes contrôlés de manière coordonnée menèrent à la conclusion que souvent des groupes de gènes contigus produisent un messager polycistronique. La synthèse de cet ARNm et sa traduction en protéine procèdent dans la même direction (voir aussi le chapitre 13). Ceci permet de comprendre le comportement d'une classe particulière de mutations, les **mutations polaires**. Ces mutations affectent non seulement le gène dans lequel elles sont localisées mais réduisent ou éliminent aussi l'expression de tous les gènes qui se trouvent en aval, c'est-à-dire sont «distaux» par rapport au gène qui contient la mutation. Les mutations polaires exercent leurs effets en interférant avec la poursuite de la transcription ou de la traduction d'un ARNm polycistronique. La première mutation polaire à être caractérisée fut une mutation d'arrêt de lecture (mutation non-sens) qui était localisée dans la partie amont du gène *Z* et réduisait le taux de synthèse de la perméase et de la transacétylase. D'autres mutations polaires s'avérèrent résulter d'insertions d'ADN au milieu de gènes (voir le chapitre 21).



Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG)

Figure 18-4. Structure de l'IPTG, inducteur de l'opéron *lac*. La liaison β-D-thiogalactosidique n'est pas clivée par la β-galactosidase, ce qui permet la modulation de la concentration intracellulaire de cet inducteur.

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Le gène *I*

Une analyse génétique plus approfondie permit de voir plus clair dans ce circuit de régulation. Jacob et Monod définirent une nouvelle classe de mutants qui synthétisaient les trois enzymes au taux maximal même en l'absence d'inducteur. Pour la première, fois on avait obtenu des mutants affectés non dans *l'activité* d'une enzyme mais dans le contrôle de sa *production*. Ces **mutants constitutifs** (toujours exprimés de manière non régulée) s'avérèrent contenir des mutations localisées à proximité mais néanmoins en dehors des gènes *Z*, *Y* et *A*, permettant ainsi de définir le **locus** *I* comme la région qui contrôle l'inductibilité des enzymes du système *lac*. Les cellules I^+ ne produisent le taux maximal des enzymes de *lac* qu'en présence d'un inducteur, tandis que les cellules I^- atteignent ce niveau maximal en présence ou en absence d'inducteur. La figure 18-5 décrit l'organisation de la région *lac* telle qu'elle ressort de ces expériences.

Le répresseur

Arthur Pardee réalisa avec François Jacob et Jacques Monod une expérience qui démontra que le gène *I* détermine la synthèse d'une molécule, un répresseur, qui bloque l'activation des gènes *lac*. Cette expérience connue sous le nom d'*expérience de Pajamo* (une combinaison des noms de ses trois auteurs) est décrite dans la figure 18-6. La conjugaison d'un donneur Hfr avec un récepteur F^- aboutit au transfert d'un fragment du chromosome Hfr dans la cellule F^-. Si ce fragment contient les gènes *lac*, les cellules réceptrices deviennent diploïdes pour ces gènes. Cette diploïdie partielle se maintient pendant plusieurs heures pendant lesquelles il est possible de suivre l'activité des gènes. Dans leur expérience, les cellules réceptrices F^-, étant I^-Z^-, ne pouvaient pas synthétiser de β-galactosidase active. Mais, peu après l'introduction d'un segment de chromosome I^+Z^+ du donneur Hfr, les cellules acquéraient la capacité de synthétiser la β-galactosidase. Toutefois, comme le montre la figure 18-6, cette synthèse s'arrêtait après environ un heure. Mais la synthèse de la β-galactosidase se poursuivait si un inducteur comme l'IPTG était ajouté à ce moment. En d'autres mots, la synthèse de la β–galactosidase devenait inductible au bout d'une heure. L'interprétation la plus simple de ces observations était que le produit du gène *I* était absent du cytoplasme des cellules réceptrices I^-Z^-, de telle sorte que lorsque le fragment de chromosome I^+Z^+ était introduit, la synthèse de la β-galactosidase pouvait débuter immédiatement à son taux maximal. Toutefois, le produit du gène *I* pouvait également être synthétisé et, après, une heure, atteindre une concentration suffisante dans le cytoplasme pour bloquer, ou «réprimer», la synthèse de la β-galactosidase. L'addition d'IPTG inactivait le produit du gène *I* et permettait donc l'induction.

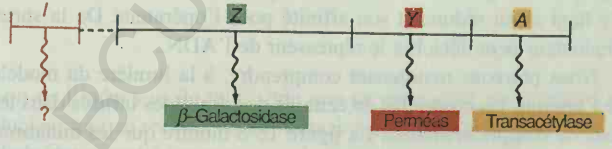


Figure 18-5. Le locus *I* : la région qui contrôle l'inductibilité des enzymes *lac*.

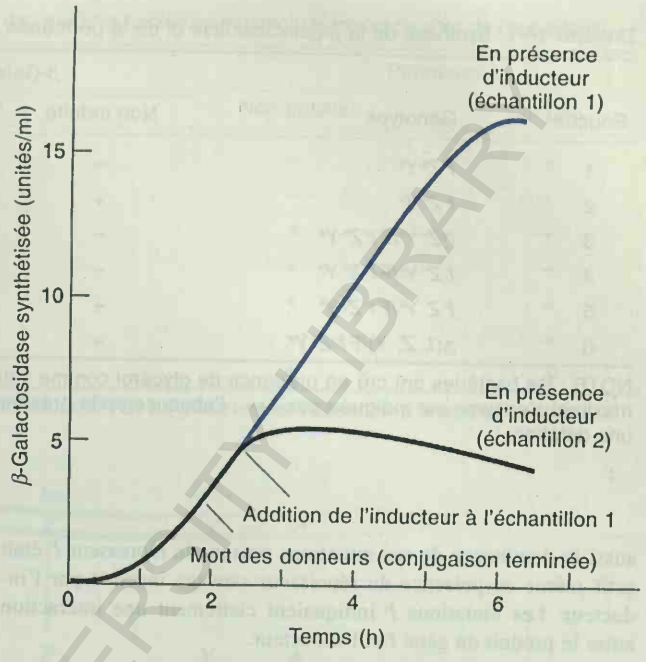


Figure 18-6. L'expérience de Pajamo. Après la conjugaison de cellules I^+Z^+ (donneuses) avec des cellules I^-Z^- (réceptrices) en absence d'inducteur, les donneuses furent tuées. Les mérozygotes (I^+Z^+ / I^-Z^-) produisaient de la β-galactosidase pendant environ 2h même en absence d'inducteur (échantillon 2) et ensuite la synthèse prenait fin. Ce n'est que lorsque de l'inducteur était ajouté (échantillon 1) que la synthèse se poursuivait. (Voir A. B. Pardee, F. Jacob et J. Monod, *Journal of Molecular Biology* 1, 1959, 165.)

La découverte de facteurs F' (voir le chapitre 10) porteurs de la région *lac* rendit possible la construction de diploïdes stables et la réalisation de tests de complémentation plus directs. Souvenez-vous des tests de complémentation effectués par Seymour Benzer, décrits au chapitre 12, où la complémentation qui se produit en position trans implique l'action d'un produit diffusible. Des tests avec I^+ et I^- montrèrent que I^+ est dominant sur I^- en position trans. Ce sont ces observations qui conduisirent Jacob et Monod à formuler l'hypothèse que le gène *I* détermine la synthèse d'une molécule de «répresseur» qui agit par la voie du cytoplasme. Le tableau 18-1 montre l'effet de diverses combinaisons de mutations, dans les états induit et non induit, sur la production de la β–galactosidase et de la perméase.

Un élément de plus en faveur du modèle du répresseur fut fourni par la caractérisation des mutations I^s. Tout en étant localisées dans le gène *I*, ces mutations empêchaient l'induction des enzymes du système *lac* par le lactose ou par l'inducteur synthétique IPTG (figure 18-4). De plus, elles étaient dominantes en trans par rapport aux allèles I^+ et I^- (tableau 18-2). La mutation I^s élimine la réponse à l'inducteur, en altérant probablement le site stéréospécifique de cet inducteur et donc sa liaison au répresseur. C'est pourquoi, même en présence d'IPTG, ces molécules peuvent continuer à bloquer la synthèse des enzymes du système *lac*. Ceci expliquait

BCU IAT CAMPUS UNIVERSITY LIBRARY

Tableau 18-1. Synthèse de la β-galactosidase et de la perméase dans des souches haploïdes et diploïdes hétérozygotes.

Souche	Génotype	β-Galactosidase		Perméase	
		Non induite	Induite	Non induite	Induite
1	$I^+Z^+Y^+$	–	+	–	+
2	$I^-Z^+Y^+$	+	+	+	+
3	$I^+Z^-Y^+/FI^-Z^+Y^+$	–	+	–	+
4	$I^-Z^-Y^+/FI^+Z^+Y^-$	–	+	–	+
5	$I^-Z^-Y^+/FI^-Z^+Y^+$	+	+	+	+
6	$\Delta(I, Z, Y)/FI^-Z^+Y^+$	+	+	+	+

NOTE : les bactéries ont crû en présence de glycérol comme source de carbone et ont été induites par l'IPTG. La présence d'un taux maximal d'enzyme est indiquée par «+» ; l'absence ou la présence d'un taux très faible d'enzyme sont indiqués par «–» ; «Δ» indique une délétion.

aussi la dominance de ces mutations puisque le répresseur I^s était actif même en présence du répresseur sauvage inactivé par l'inducteur. Les mutations I^s indiquaient clairement une interaction entre le produit du gène *I* et l'inducteur.

Message La mutation I^- altère la *région de liaison à l'ADN* du répresseur. Elle empêche donc sa liaison à l'ADN et permet la transcription des gènes *lac* même en l'*absence* d'inducteur. La mutation I^s touche la *région de liaison de l'inducteur* du répresseur et réprime la transcription même en *présence* d'inducteur.

L'opérateur et l'opéron

La spécificité de l'action du répresseur, qui se traduit par l'arrêt de la synthèse des enzymes du système *lac*, suggère la formation d'un complexe stéréospécifique avec un élément que Jacob et Monod dénommèrent l'«opérateur». L'opérateur était sensé être une région proche du début des gènes qu'il contrôle. Ces chercheurs s'efforcèrent dès lors d'obtenir des mutations de ces éléments de reconnaissance permettant la synthèse des enzymes du système *lac* même en présence d'un répresseur actif. Ces mutations devaient être dominantes en position cis. Alors que la trans-dominance indique un produit diffusible, la cis-dominance reflète l'action d'un élément qui n'affecte que les gènes qui lui sont adjacents. Aucun produit diffusible n'est altéré par la mutation. En sélectionnant la constitutivité (synthèse non répressible) dans des cellules possédant deux copies de la région *lac*, afin éliminer l'effet de mutations I^- uniques, de tels mutants furent obtenus et appelés O^c pour **opérateur constitutif**. Comme l'indique le tableau 18-3, les souches porteuses de ces mutations synthétisent des quantités maximales d'enzyme en présence d'IPTG mais produisent aussi 10 à 20 pour cent de ces quantités en absence d'inducteur. Les mutations O^c sont dominantes en position cis, comme le montre le tableau 18-3. Des expériences de cartographie génétique ont placé le locus opérateur entre *I* et *Z*.

Tableau 18-2. Synthèse de la β-galactosidase et de la perméase par la souche sauvage et par des souches portant différents allèles du gène *I*.

Génotype	Inducteur	β-Galactosidase	Perméase
$I^+Z^+Y^+$	Néant	–	–
	IPTG	+	+
$I^sZ^+Y^+$	Néant	–	–
	IPTG	–	–
$I^sZ^+Y^+/FI^+$	Néant	–	–
	IPTG	–	–
$I^sZ^+Y^+/FI^-$	Néant	–	–
	IPTG	–	–

NOTE : Les bactéries ont crû en présence de glycérol avec et sans l'inducteur IPTG. La présence des enzymes est représentée par «+» ; l'absence ou un niveau peu élevé sont indiqués par «–».

Comme nous l'avons vu, le segment *OZYA* constitue une unité génétique d'expression coordonnée que Jacob et Monod ont appelée *opéron*. La figure 18-7 décrit un modèle simplifié de l'opéron *lac*. On dit que l'opéron *lac* est soumis au **contrôle négatif** du répresseur de *lac* puisque le répresseur bloque l'expression des gènes du système *lac* en l'absence d'inducteur.

Examinons le modèle de la figure 18-7 tel qu'il a été proposé par Jacob et Monod. Les gènes *Z* et *Y* sont les gènes de structure de deux enzymes nécessaires pour le catabolisme du lactose, la β–galactosidase et la perméase. Le gène *A* code pour la transacétylase. Tous trois sont liés sur le chromosome. Leur transcription sous la forme d'un ARNm polycistronique (unique) constitue la base d'une régulation coordonnée au niveau de la synthèse de l'ARNm. La synthèse de l'ARNm polycistronique de *lac* peut être bloquée sous l'action d'une protéine jouant le rôle de répresseur qui se lie à une région opérateur proche du site d'initiation de la transcription. Le répresseur est le produit du gène *I*. C'est pourquoi les mutations du gène *I* qui empêchent la synthèse d'un répresseur fonctionnel entraînent une synthèse non réprimée, ou constitutive, des enzymes du système *lac*. La répression peut également être surmontée par certains galactosides, qualifiés d'*inducteurs*, qui inactivent le répresseur en s'y liant et en réduisant son affinité pour l'opérateur. De la sorte, l'inducteur peut détacher le répresseur de l'ADN.

Nous pouvons maintenant comprendre, à la lumière du modèle de l'opéron, les propriétés de certains des diploïdes utilisés dans les tests de complémentation. La figure 18-8 montre que les mutations I^- sont récessives vis-à-vis du type sauvage, parce qu'un seul gène *I* fonctionnel suffit à produire un répresseur qui se lie aux deux copies de l'opérateur d'une cellule diploïde. D'autre part, la figure 18-9 montre une cellule diploïde porteuse d'une copie du gène *I* de type sauvage et une copie d'un gène I^s. La mutation I^s altère le site de liai-

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

Tableau 18-3. La synthèse de la β-galactosidase et de la perméase par des mutants haploïdes et diploïdes hétérozygotes de l'opérateur.

Génotype	β-Galactosidase		Perméase	
	Non induite	Induite	Non induite	Induite
$O^+Z^+Y^+$	–	+	–	+
$O^+Z^+Y^+/FO^+Z^-Y^+$	–	+	–	+
$O^cZ^+Y^+$	+	+	+	+
$O^+Z^+Y^-/FO^cZ^+Y^+$	+	+	+	+
$O^+Z^+Y^+/FO^cZ^-Y^+$	–	+	+	+
$O^+Z^-Y^+/FO^cZ^+Y^-$	+	+	–	+
$I^sO^+Z^+Y^+/FI^+O^cZ^+Y^+$	+	+	+	+

NOTE : Les bactéries ont crû en présence de glycérol avec et sans l'inducteur IPTG. La présence et l'absence d'enzymes sont indiquées par «+ » et «–», respectivement.

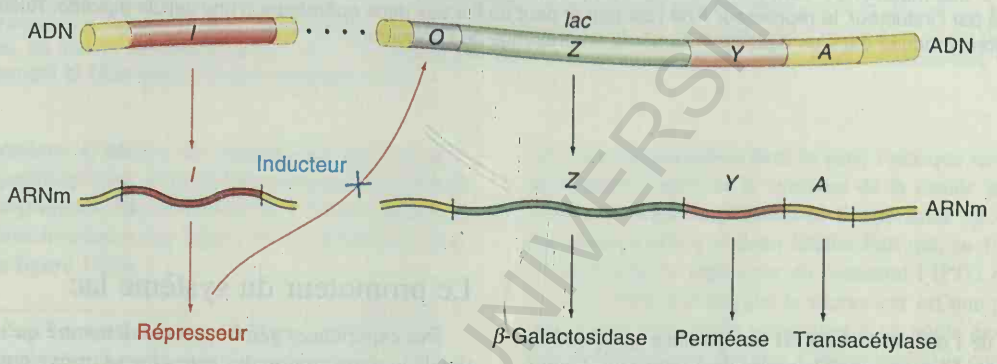


Figure 18-7. Un modèle simplifié de l'opéron *lac*. Les trois gènes *Z, Y et A* sont exprimés de manière coordonnée. Le produit du gène *I*, le répresseur, bloque l'expression de *Z, Y et A* en interagissant avec l'opérateur (*O*). L'inducteur peut inactiver le répresseur, en empêchant donc son interaction avec l'opérateur. Lorsque ceci se produit, l'opéron est exprimé à son taux maximal. Des mutations de *I* ou de *O* peuvent également entraîner la synthèse des trois enzymes *lac*, même en l'absence d'inducteur.

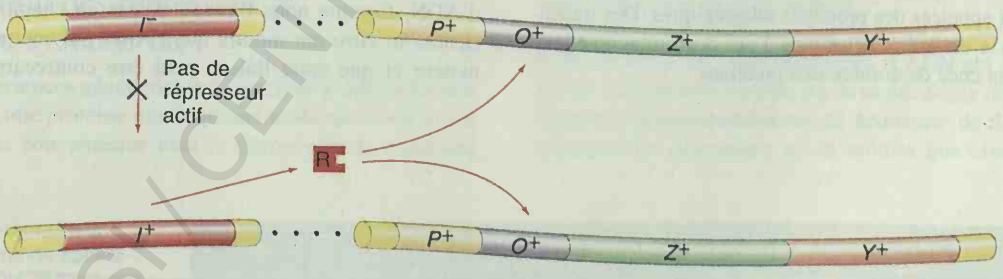


Figure 18-8. Les mutations I^- sont récessives par rapport à l'allèle de type sauvage. Bien qu'aucun répresseur actif ne soit synthétisé à partir du gène I^-, le gène sauvage (I^+) produit des répresseurs fonctionnels qui se lient aux deux opérateurs de la cellule diploïde et empêchent l'expression de l'opéron *lac* (en absence d'inducteur).

son de l'inducteur de telle sorte que ce répresseur ne lie plus l'inducteur tout en reconnaissant normalement l'opérateur. Ces cellules diploïdes seront Lac^- parce que le répresseur muté se lie toujours à l'opérateur, même en présence d'inducteur, et bloque la synthèse des enzymes du système *lac*.

Les mutations opérateur (O^c) sont cis-dominantes parce qu'elles ne sont dominantes que vis-à-vis des gènes auxquels elles sont directement liées sur le même chromosome, comme le schématise la figure 18-10. Ainsi, si un opérateur muté se trouve dans la même cellule qu'un second chromosome porteur d'un opérateur de type sauvage, le répresseur reconnaîtra cet opérateur sauvage et réprimera les gènes qui lui sont liés, mais ne se liera pas à l'opérateur modifié. C'est pourquoi les gènes liés à l'opérateur muté sont exprimés même en l'absence d'inducteur.

MCGILL UNIVERSITY LIBRARY

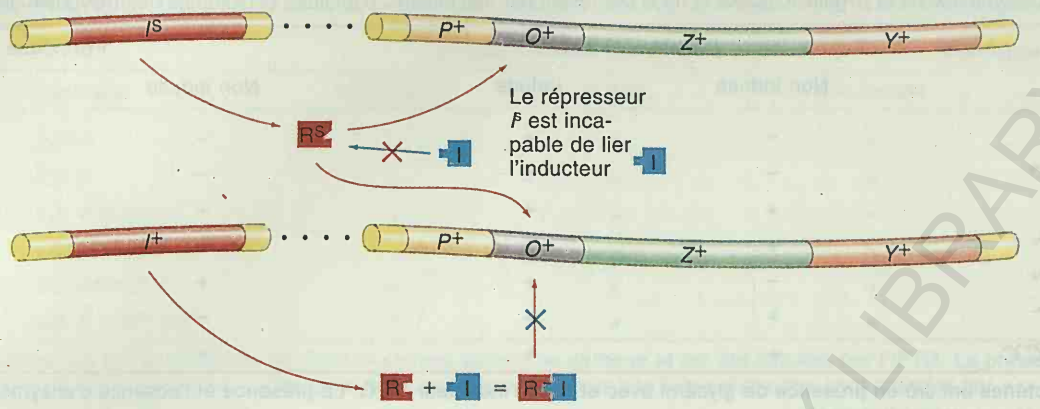


Figure 18-9. Les mutations I^S sont dominantes par rapport à l'allèle de type sauvage. Alors que le répresseur de type sauvage est inactivé par l'inducteur, le répresseur I^S ne l'est pas et peut se lier aux deux opérateurs d'une cellule diploïde. Aucune enzyme n'est donc produite dans un diploïde I^S/I^+, même en présence de l'inducteur.

L'allostérie

Le répresseur de l'opéron lactose est une protéine qui possède deux sites de liaison. L'un reconnaît la molécule d'inducteur, l'autre la séquence de l'opérateur du système *lac* sur l'ADN. L'interaction du répresseur avec l'inducteur diminue l'affinité du répresseur pour l'opérateur. Cette modification de l'affinité pour l'opérateur en réponse à la liaison de l'inducteur à un site éloigné de la molécule de répresseur est provoquée par un changement de la conformation de cette molécule. Dans une de ses conformations, le répresseur se lie à l'opérateur, dans l'autre pas. Les protéines qui se comportent de cette manière sont appelées des protéines **allostériques**. Des transitions allostériques, c'est-à-dire le passage d'une conformation à une autre, se produisent chez de nombreuses protéines.

Le promoteur du système lac

Des expériences génétiques ont démontré qu'un élément essentiel de la transcription des gènes *lac* se trouve entre *I* et *O*. Cet élément, appelé le *promoteur* (*P*), est le site d'initiation de la transcription. Les mutations du promoteur affectent de manière identique tous les gènes d'un opéron. Elles sont cis-dominantes ; c'est ce qu'on attend de mutations qui affectent un site qui joue le rôle d'élément de reconnaissance pour l'initiation de la transcription, puisque chaque promoteur commande uniquement la transcription de gènes groupés dans un opéron adjacent sur la même molécule d'ADN. Comme nous l'avons exposé au chapitre 13, des expériences in vitro ont montré que l'ARN polymérase se lie au promoteur et que cette liaison peut être contrecarrée par celle du

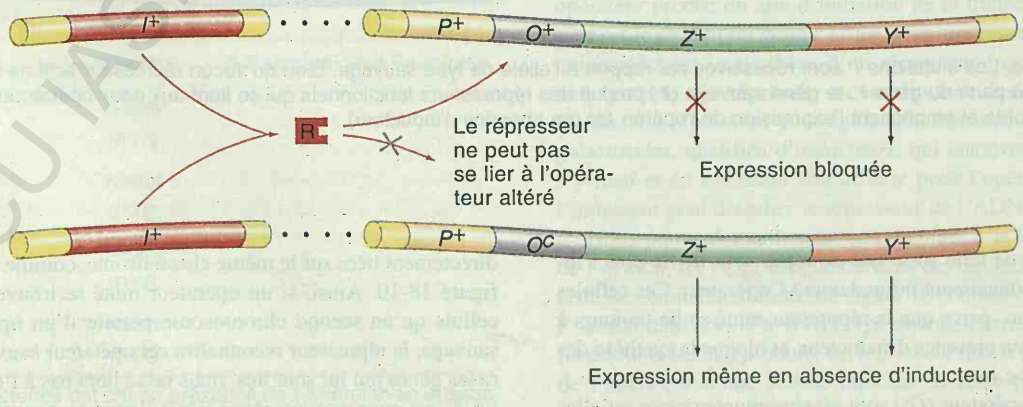


Figure 18-10. Les mutations O^C sont dominantes en position *cis*. Etant donné qu'un répresseur ne peut pas se lier à un opérateur muté (O^C), les gènes adjacents à cet opérateur sont exprimés en l'absence d'inducteur. Néanmoins, les gènes contigus à un opérateur sauvage O^+ restent soumis à la répression.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

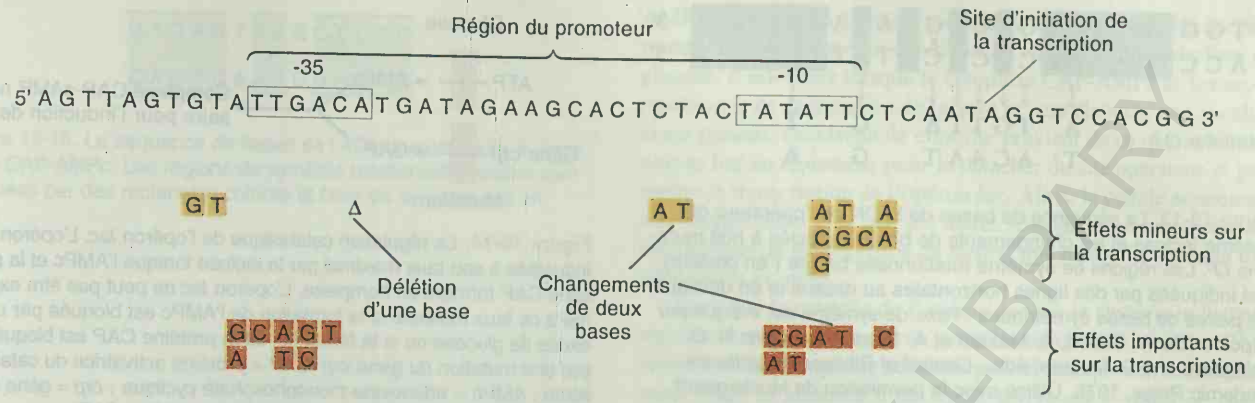


Figure 18-11. Des séquences d'ADN spécifiques sont importantes pour la transcription efficace des gènes d'*E. coli* par l'ARN polymérase. Les séquences entourées d'une boîte rectangulaire présentes aux environs des positions –35 et –10 sont très bien conservées dans tous les promoteurs d'*E. coli*. Les mutations de ces régions ont des effets mineurs (jaune) ou appréciables (orange) sur l'efficacité de la transcription. Les mutations peuvent être des changements d'un seul ou d'une paire de nucléotides, ou encore des délétions (Δ). (De J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller. *ADN Recombinant*, 1ère édit. franç. Copyright © 1994 par De Boeck-Wesmael, S.A.)

répresseur à l'opérateur. L'analyse de mutants, les mesures physiques et la comparaison avec d'autres promoteurs ont identifié deux séquences impliquées dans la liaison de l'ARN polymérase aux promoteurs procaryotiques. La figure 18-11 résume ces données (voir aussi la figure 13-8).

Message L'opéron *lac* est un groupe de gènes qui spécifient les enzymes impliquées dans le métabolisme du lactose. Ces gènes sont contrôlés par l'action coordonnée de régions promoteur et opérateur qui n'agissent qu'en position cis. L'activité de ces régions est à son tour déterminée par un répresseur spécifié par un gène régulateur distinct. La figure 18-1 rassemble toutes ces informations dans un schéma.

Caractérisation des répresseur et opérateur du système lac

Diverses expériences génétiques ont contribué à démontrer que le répresseur est une protéine plutôt qu'une molécule d'ARN, par exemple. La plus convaincante était la découverte de mutations non-sens suppressibles dans le gène *I* puisque les codons non-sens provoquent l'arrêt de la synthèse de la chaîne polypeptidique en cours de traduction. Toutefois, l'expérience décisive fut réalisée par Walter Gilbert et Beno Müller-Hill qui, en 1966, identifièrent et purifièrent le répresseur en mesurant l'IPTG radioactif qui s'y fixe. Ils démontrèrent que le répresseur est une protéine comportant quatre sous-unités identiques d'un poids moléculaire d'environ 38.000 daltons chacune. Chaque molécule contient quatre sites de liaison de l'IPTG (une description plus détaillée du répresseur sera donnée plus loin dans ce chapitre). In vitro, le répresseur se lie à un fragment d'ADN comportant l'opérateur (voir la figure 18-12) et s'en détache en présence d'IPTG. Gilbert et ses collaborateurs montrèrent que le répresseur peut protéger des bases précises de l'opérateur contre des agents chimiques. Ces expériences apportèrent la preuve définitive du mécanisme d'action du répresseur proposé par Jacob et Monod.

Gilbert utilisa la DNase pour dégrader l'ADN lié au répresseur. Il put recueillir de courts fragments d'ADN qui avaient été protégés de l'action de l'enzyme par la molécule de répresseur et représentaient vraisemblablement la séquence de l'opérateur. Cette séquence fut déterminée et on montra que chaque mutation de

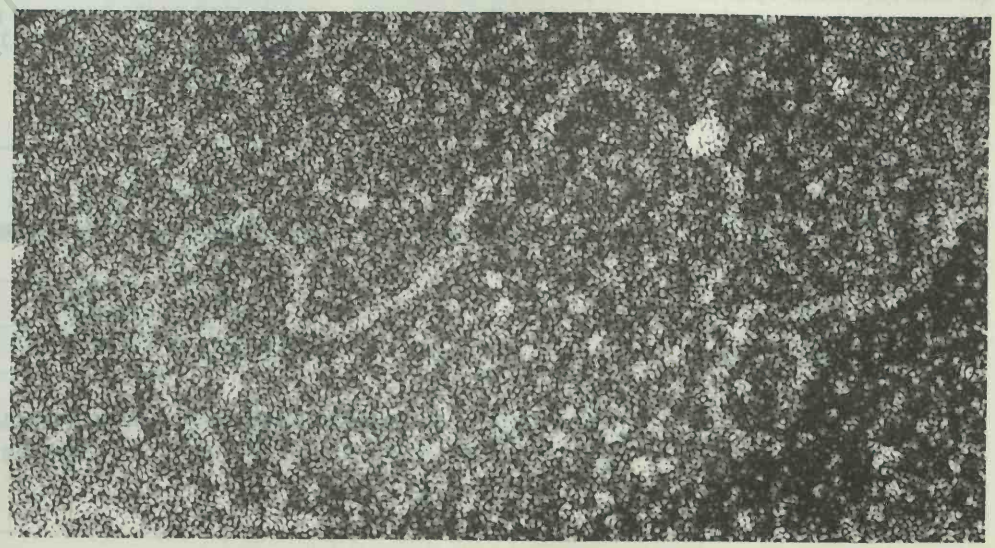


Figure 18-12. Le répresseur de l'opéron *lac* (grande sphère blanche) lié à l'ADN de la région promoteur de l'opéron (Photographie présentée grâce à l'obligeance de Jack D. Griffith).

BCU ASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

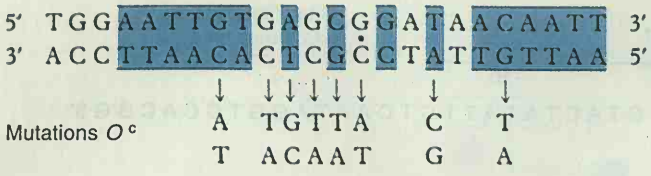


Figure 18-13. La séquence de bases de l'ADN de l'opérateur du système lactose et les changements de bases associés à huit mutations O^c. Les régions de symétrie rotationnelle binaire (en couleur) sont indiquées par des lignes horizontales au dessus et en dessous des paires de bases symétriques ; l'axe de symétrie est indiqué par un point. (De W. Gilbert, A. Maxam et A. Mirzabekov, dans N. O. Kjeldgaard and O. Maaløe, édit., *Control of Ribosome Synthesis.* Academic Press, 1976. Utilisé avec la permission de Munksgaard International Publishers Ltd., Copenhagen).

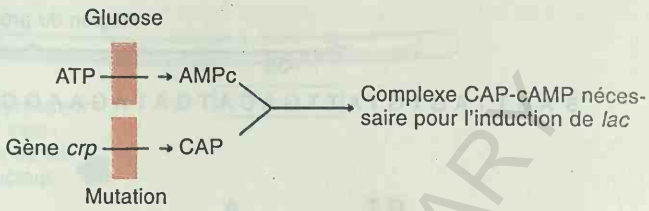


Figure 18-14. La régulation catabolique de l'opéron *lac*. L'opéron est inductible à son taux maximal par le lactose lorsque l'AMPc et la protéine CAP forment un complexe. L'opéron *lac* ne peut pas être exprimé à ce taux maximal si la formation de l'AMPc est bloquée par un excès de glucose ou si la formation de la protéine CAP est bloquée par une mutation du gène *crp* (CAP = protéine activatrice du catabolisme ; AMPc = adénosine monophosphate cyclique ; *crp* = gène de structure responsable de la synthèse de la protéine CAP).

l'opérateur résulte d'une altération de la séquence (figure 18-13). Ces résultats identifièrent le locus opérateur comme une séquence de 17 à 25 nucléotides située immédiatement en amont du gène de structure *Z*. Ils montrèrent aussi l'étonnante spécificité de l'interaction répresseur-opérateur qui est perturbée par le changement d'une seule base. Lorsqu'on détermina la séquence de bases de l'ARNm de l'opéron *lac*, il apparut que les 21 bases de son extrémité 5' étaient complémentaires de la séquence que Gilbert avait établie pour l'opérateur.

La répression catabolique de l'opéron *lac* : un contrôle positif

Un mécanisme de régulation supplémentaire s'ajoute au système répresseur-opérateur. Ce mécanisme permet à la cellule d'utiliser préférentiellement les enzymes qui réalisent le transport et le métabolisme du glucose. Si le lactose *et* le glucose sont présents simultanément, la synthèse de la β-galactosidase n'est pas induite tant que le glucose n'a pas été épuisé. Ainsi, la cellule se sert de la machinerie métabolique existante pour utiliser tout le glucose disponible avant d'envisager l'installation d'une nouvelle machinerie qui lui permettra d'utiliser le lactose. Le modèle de l'opéron tel que nous l'avons décrit plus haut ne rend pas compte de cette inhibition par le glucose de l'induction du système lactose. Aussi devons-nous le compléter.

Les observations suggèrent qu'un produit de la dégradation du glucose (dont nous ignorons encore l'identité exacte) empêche l'induction de l'opéron *lac* par le lactose ; c'est pourquoi cet effet fut appelé initialement **répression catabolique**. L'effet de ce produit du catabolisme du glucose s'exerce, par un mécanisme que nous verrons plus loin, au niveau de la production d'un constituant cellulaire important appelé l'*adénosine monophosphate cyclique* (*AMPc*).

Lorsque le glucose est présent en concentration élevée, la concentration d'AMPc est faible ; lorsque la concentration de glucose diminue, celle de l'AMPc augmente en rapport. Une concentration élevée d'AMPc est nécessaire pour l'activation de l'opéron *lac*. Les mutants qui sont incapables de convertir l'ATP en AMP cyclique ne peuvent pas être induits à produire la β-galactosidase étant donné que la concentration d'AMPc n'est pas suffisante pour activer l'opéron *lac*. De plus, il existe d'autres mutants qui produisent l'AMPc mais sont incapables d'induire les enzymes du système *lac* parce qu'ils sont dépourvus d'une autre protéine appelée *CAP* (*protéine activatrice du catabolisme*) et produite par le gène *crp*. La protéine CAP forme un complexe avec l'AMPc et c'est ce complexe qui active l'opéron *lac* (figure 18-14).

Comment la répression catabolique s'intègre-t-elle dans notre modèle de structure et de régulation de l'opéron *lac* ? Rappelez-vous la technique utilisée par Gilbert pour identifier la séquence de base de l'opérateur. Dans une expérience analogue, le complexe CAP-AMPc fut mis en présence de l'ADN et celui-ci fut soumis à la digestion par la DNase. Les fibres-subsistantes sont

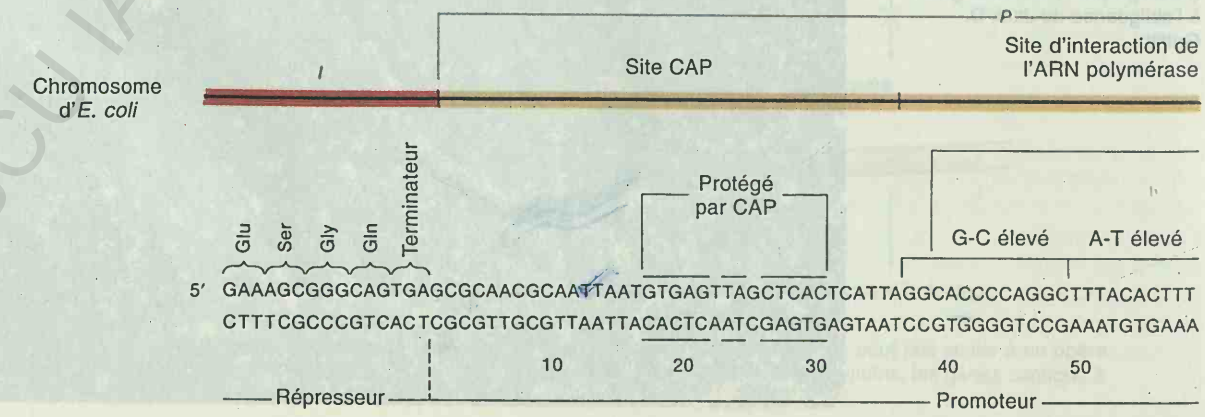


Figure 18-15. La séquence de bases de l'ADN auquel se lie le complexe CAP-AMPc. Les régions de symétrie rotationnelle binaire sont indiquées par des rectangles colorés et l'axe de symétrie par un point.

probablement celles qui sont protégées de la digestion par le complexe CAP-AMPc lié à l'ADN ; la séquence de ces fibres (figure 18-15) est tout à fait différente de celle de l'opérateur (figure 18-13) mais présente également une symétrie rotationnelle binaire.

L'opéron *lac* tout entier peut être inséré dans le phage λ de telle sorte que l'initiation de la transcription soit sous le contrôle du gène de phage adjacent à *lac*. Le transcrit produit dans ces conditions comporte une séquence complémentaire de la séquence de base de la région de contrôle de l'opéron *lac* (une séquence normalement absente de l'ARNm de cet opéron). Nous connaissons déjà les séquences d'acides aminés du répresseur et de la β-galactosidase ; une fois ces séquences identifiées, les séquences restantes peuvent donc être attribuées aux régions de contrôle (figure 18-16). Nous pouvons également introduire les sites de liaison que nous connaissons déjà, c'est-à-dire ceux du répresseur, du complexe CAP-AMPc et de l'ARN polymérase dans le modèle détaillé décrit dans les figures 18-16 et 18-17. La figure 18-17d montre que la liaison de la protéine CAP à l'ADN provoque la courbure de celui-ci. Ceci facilite probablement la liaison de l'ARN polymérase au promoteur. Il existe aussi des preuves de ce que la protéine CAP établit avec les sous-unités α de l'ARN polymérase des contacts protéine-protéine directs qui sont importants pour l'effet activateur de la protéine CAP (voir la figure 18-17e).

La régulation par le glucose provient de ce qu'un produit du catabolisme du glucose inhibe la formation du complexe CAP-AMPc nécessaire à l'attachement de l'ARN polymérase au promoteur de *lac*. Même en condition de carence des catabolites du glucose, c'est-à-dire lorsque le complexe CAP-AMPc se forme, la machinerie de dégradation du lactose ne sera élaborée que si celui-ci est présent. Ce niveau de contrôle provient de ce que le lactose doit se lier au répresseur pour le détacher du site opérateur et permettre la transcription de l'opéron *lac*. Ainsi, la cellule économise son énergie aussi bien que ses autres ressources en ne produisant les enzymes du métabolisme du lactose que lorsqu'ils sont à la fois nécessaires et utiles.

Alors que le contrôle de l'opéron *lac* par le système inducteur-répresseur est un exemple de contrôle négatif, le système CAP-AMPc est un exemple de **contrôle positif** puisque son fonctionnement exige la présence d'un signal activateur — dans ce cas-ci l'interaction du complexe CAP-AMPc avec la région CAP. La figure 18-18 fait la distinction entre ces deux modes de contrôle fondamentalement différents.

Message L'opéron *lac* possède un niveau de contrôle supplémentaire qui lui permet de rester inactif en présence de glucose même si du lactose est également présent. Des concentrations élevées de catabolites du glucose se traduisent par de faibles concentrations de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dont la liaison à la protéine CAP est nécessaire pour l'induction de l'opéron *lac*.

En utilisant différentes combinaisons d'éléments de contrôle, les bactéries ont développé diverses stratégies de régulation de l'expression des gènes. En voici quelques exemples.

Un double contrôle positif et négatif : l'opéron arabinose

Le métabolisme de l'arabinose, un autre sucre, est catalysé par trois enzymes codées par les gènes *araB*, *araA* et *araD*. La figure 18-19 décrit cet opéron. Son expression est activée au niveau de la région **initiateur,** *araI*. En s'attachant à cette région après avoir lié l'arabinose, le produit du gène *araC* active la transcription, vraisemblablement en affectant directement la liaison de l'ARN poly-

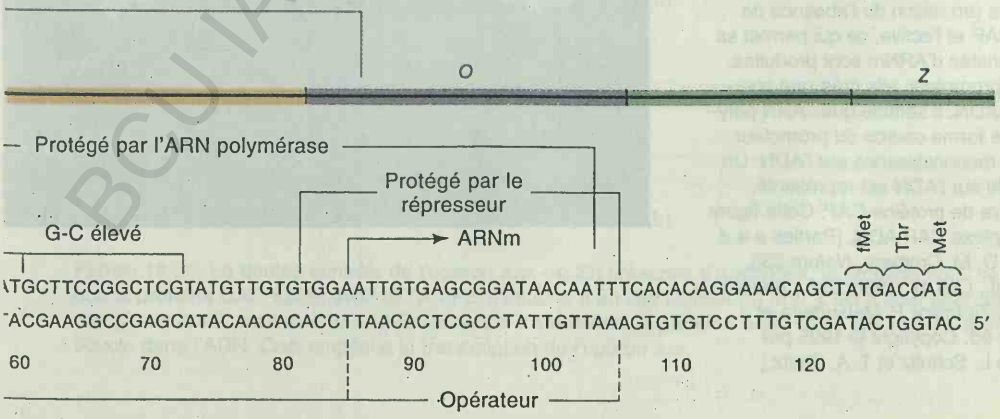
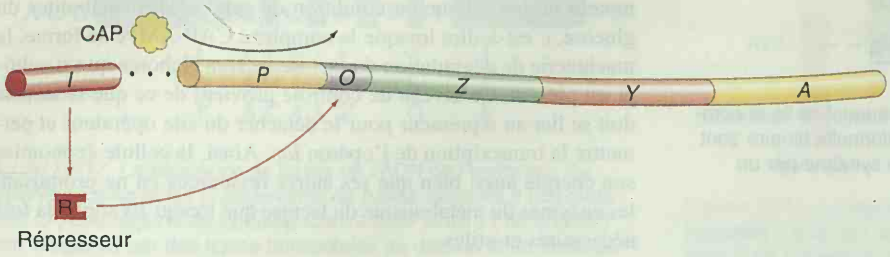


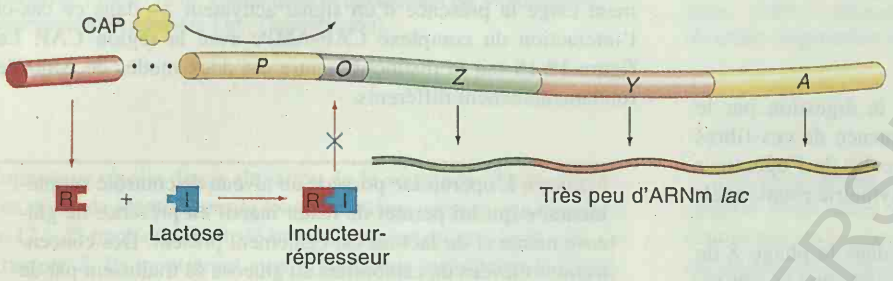
Figure 18-16. La séquence de bases et les limites génétiques de la région de contrôle de l'opéron *lac*, avec le début de la séquence du gène de structure *Z* (D'après R. C. Dickson, J. Abelson, W. M. Barnes et W. S. Reznikoff, «Genetic Regulation : The *Lac* Control Region». *Science* 187, 1975, 27). Copyright © 1975 par l'American Association for the Advancement of Science.)

BCU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR

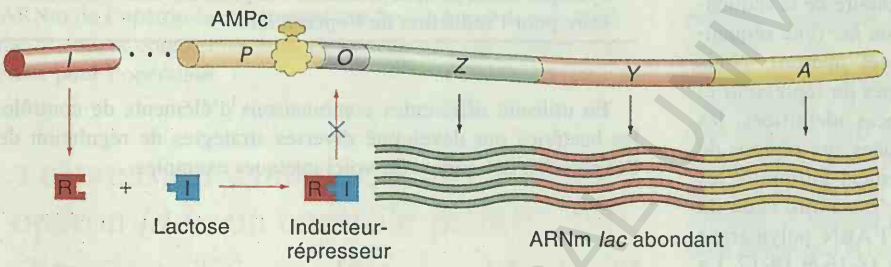
(a) Glucose présent (AMPc) ; pas de lactose ; pas d'ARNm *lac*



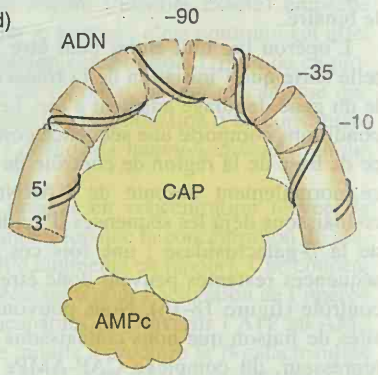
(b) Glucose présent (peu d'AMPc) ; lactose présent



(c) Pas de glucose (AMPc élevé) ; lactose présent



(d)



(e)

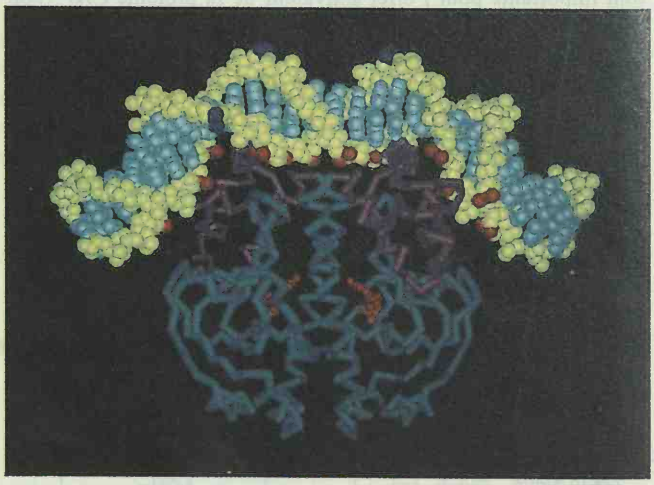


Figure 18-17. Contrôles négatif et positif de l'opéron *lac* par, respectivement, le répresseur *lac* et la protéine activatrice du catabolisme (CAP). (a) En l'absence de lactose, l'inducteur, le répresseur *lac* est capable de se lier à l'opérateur ; quelle que soit la concentration d'AMPc et que la protéine CAP soit présente ou pas, la synthèse d'ARNm *lac* est réprimée. (b) En présence de lactose (ou du métabolite qui en est dérivé, l'*allolactose*), le répresseur est incapable de se lier à l'opérateur ; mais l'ARNm n'est produit qu'en faibles quantités étant donné la présence de glucose qui limite la synthèse de l'AMPc, empêchant la formation du complexe AMPc-CAP et sa liaison au promoteur. (c) Le répresseur étant inactivé par le lactose et de fortes concentrations d'AMPc étant présentes (en raison de l'absence de glucose), l'AMPc se lie à la protéine CAP et l'active, ce qui permet sa liaison au promoteur ; de grandes quantités d'ARNm sont produites. (d) Lorsque la protéine CAP se lie au promoteur, elle crée une courbure d'un rayon de plus de 90° dans l'ADN. Il semble que l'ARN polymérase se lie plus efficacement à cette forme courbe du promoteur. (e) La protéine CAP liée à son site de reconnaissance sur l'ADN. Un modèle compact de CAP liée à sa cible sur l'ADN est représenté, montrant l'ADN faisant face à un dimère de protéine CAP. Cette figure dérive de l'analyse structurale du complexe CAP-ADN. [Parties a à d redessinées d'après B. Gartenberg et D. M. Crothers, *Nature* 333, 1988, 824. (Voir H.N. Lie-Johnson et al., Cell 47, 1986, 995.) Adapté de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright © 1995 par Scientific American Books. Partie e de L. Schultz et T. A. Steitz.]

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

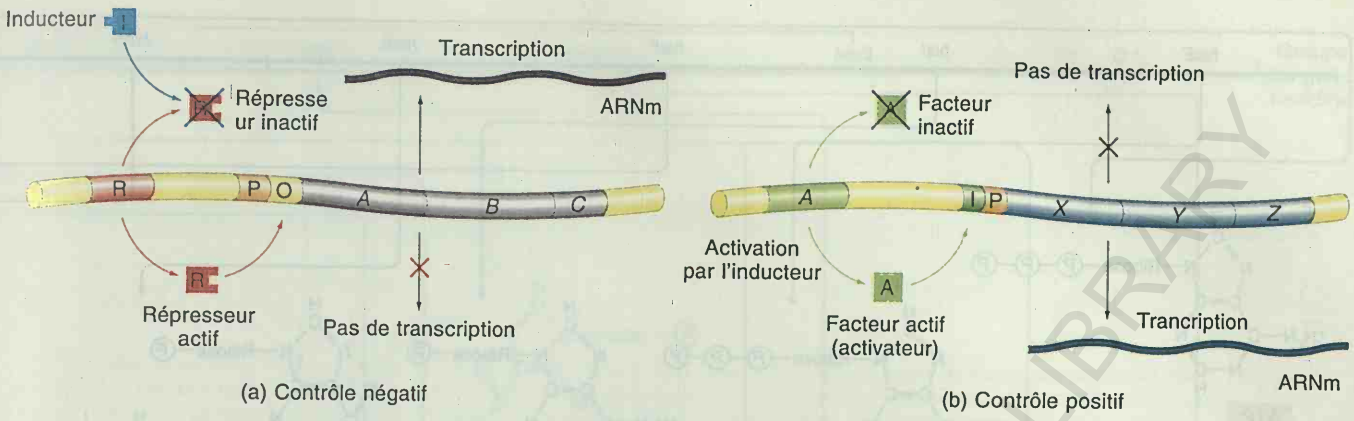


Figure 18-18. Comparaison des contrôles positif et négatif. Les aspects fondamentaux des contrôles positif et négatif sont décrits. (a) Dans un contrôle négatif, un répresseur actif (codé par le gène *R* dans l'exemple montré ici) bloque l'expression des gènes de l'opéron *ABC* en se liant au site opérateur (*O*). Un répresseur inactif autorise cette expression. Le répresseur peut être inactivé par un inducteur ou par une mutation. (b) Dans le contrôle positif, un facteur actif est nécessaire pour l'expression des gènes, comme on le montre ici pour l'opéron *XYZ*. De petites molécules peuvent convertir un facteur inactif en facteur actif, comme c'est le cas pour l'AMPc et la protéine CAP. Un facteur de contrôle positif inactif n'entraîne aucune expression génétique. L'activateur se lie à la région de contrôle de l'opéron, appelée *I* dans le cas présent. (Les positions de *O* et *I* par rapport au promoteur, *P*, sont arbitraires dans ces deux exemples.)

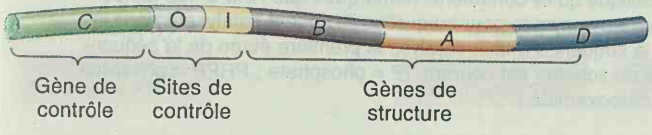


Figure 18-19. Carte de la région *ara*. Les gènes *BAD* avec les sites *I* et *O* constituent l'opéron *ara*.

mérase à la région *araI*.qui contient le promoteur pour les gènes *araB, araA et araD*. Ceci constitue un contrôle positif puisque le produit du gène de régulation (*araC*) doit être actif pour permettre l'expression de l'opéron. Un contrôle positif supplémentaire est exercé par le système CAP-AMPc qui contrôle aussi l'expression de *lac*.

En présence d'arabinose, l'attachement du produit C et de la protéine CAP à la région initiateur sont nécessaires pour la liaison de l'ARN polymérase au promoteur des gènes *araB*, *araA* et *araD* (figure 18-20a). En absence d'arabinose, le produit *araC* prend une conformation différente et, cette fois, réprime l'opéron *ara* en s'attachant à la région *araI* et à l'opérateur *araO*, imposant ainsi la

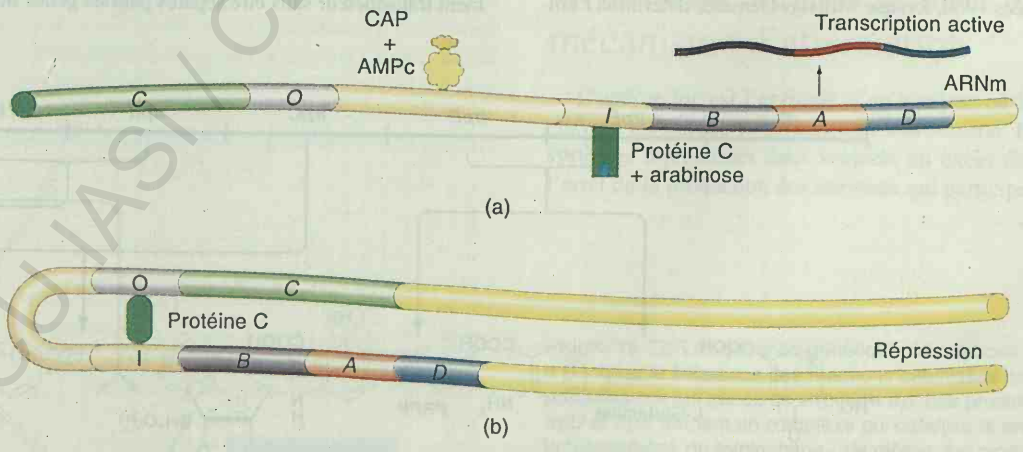


Figure 18-20. Le double contrôle de l'opéron *ara*. (a) En présence d'arabinose, la protéine *araC* se fixe à la région *araI* tandis que la protéine CAP, après avoir lié l'AMPc, s'attache à un site adjacent à *araI*. Ceci a pour effet de stimuler la transcription des gènes *araB, araA* et *araD*. (b) En absence d'arabinose, la protéine *araC* se lie aux régions *araI* et *araO* en formant une boucle dans l'ADN. Ceci empêche la transcription de l'opéron *ara*.

BCU LIASN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

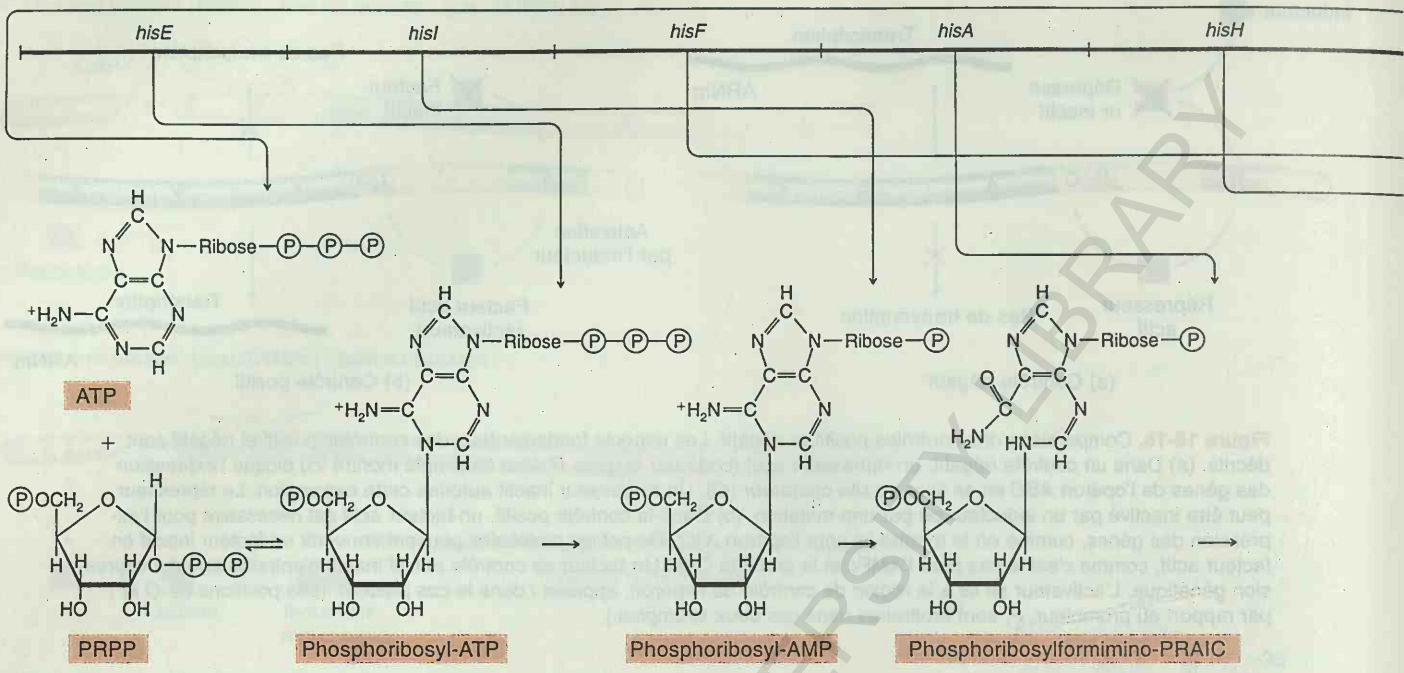
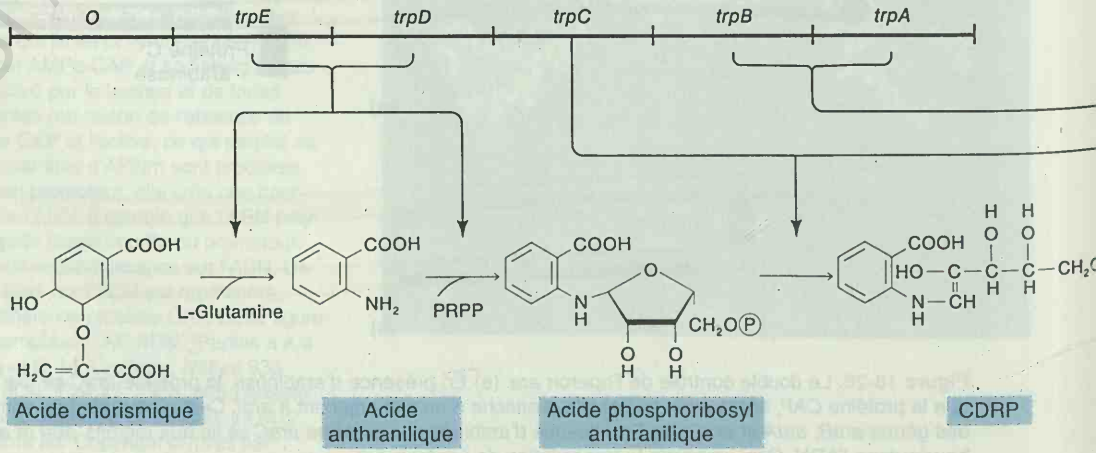


Figure 18-21. Le groupe des gènes histidine (*his*) et la voie métabolique qu'ils contrôlent. Remarquez que l'ordre des gènes dans ce groupe correspond en général avec l'ordre des étapes que les enzymes pour lesquelles ils codent catalysent dans la voie de synthèse de l'histidine. Le fait que la dernière enzyme de la séquence (*hisG*) catalyse la première étape de la séquence réactionnelle n'est probablement pas une coïncidence ; ce type de schéma est courant. (P = phosphate ; PRPP = phosphoribosyl-pyrophosphate ; PRAIC = phosphoribosyl-aminoimidazole carboxamide.)

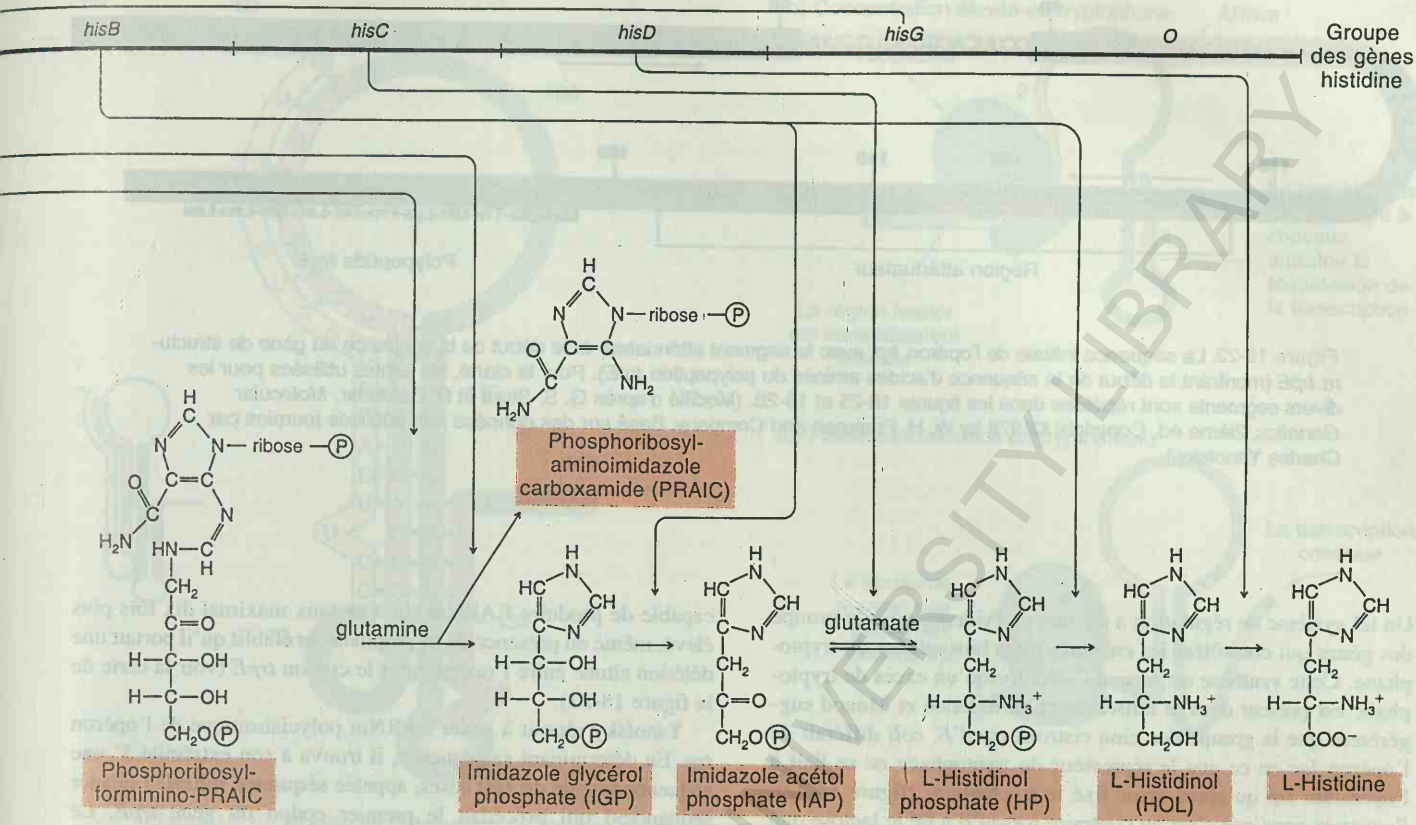
formation d'une boucle (figure 18-20b) qui fait obstacle à la transcription. Ainsi, la protéine *araC* existe sous deux conformations qui assument des fonctions différentes en se liant à des sites distincts. La conformation existante dépend de ce que l'inducteur, l'arabinose, est lié à la protéine ou pas.

Les voies métaboliques

La régulation coordonnée de gènes est fréquente chez les bactéries. Au début des années 1960, lorsque Milislav Demerec détermina l'emplacement des loci qui spécifiaient une même voie biosynthétique, il constata que les gènes qui contrôlent les étapes de la synthèse du tryptophane, un acide aminé, chez *Salmonella typhimurium* étaient groupés dans une région restreinte du génome. En 1964, il étudia la distribution des gènes impliqués dans un certain nombre de voies métaboliques différentes. En analysant des mutations auxotrophes touchant 87 gènes différents, il constata que 63 d'entre eux étaient répartis en 17 groupes correspondant à des fonctions similaires. Un **groupe** («cluster») de gènes est défini comme deux ou plusieurs loci qui contrôlent des fonctions apparentées et sont situés sur un même fragment transducteur sans être séparés par des gènes non apparentés.



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Dans les cas où la séquence des activités catalytiques était connue, on constatait une remarquable congruence entre l'ordre des gènes sur le chromosome et l'ordre dans lequel leurs produits intervenaient dans le trajet métabolique. Cette congruence est particulièrement bien illustrée par le groupe des gènes de la biosynthèse de l'histidine de *Salmonella* étudiés par Philip Hartman et Bruce Ames (figure 18-21) au début des années 1960 et par le groupe des gènes de la biosynthèse du tryptophane d'*E. coli* (figure 18-22) analysé à la même époque par Charles Yanofsky.

Message Les gènes impliqués dans un même trajet métabolique sont souvent étroitement liés sur les chromosomes procaryotiques et en général dans le même ordre que les réactions qu'ils contrôlent. De plus, les gènes d'un même groupe sont souvent exprimés simultanément.

L'opéron tryptophane : un contrôle négatif doublé d'un mécanisme d'atténuation

L'opéron *lac* est l'exemple d'un système où la synthèse d'une enzyme est induite en présence de son substrat. Il existe aussi des systèmes répressibles dans lesquels un excès de produit mène à l'arrêt de la production des enzymes qui participent à sa synthèse.

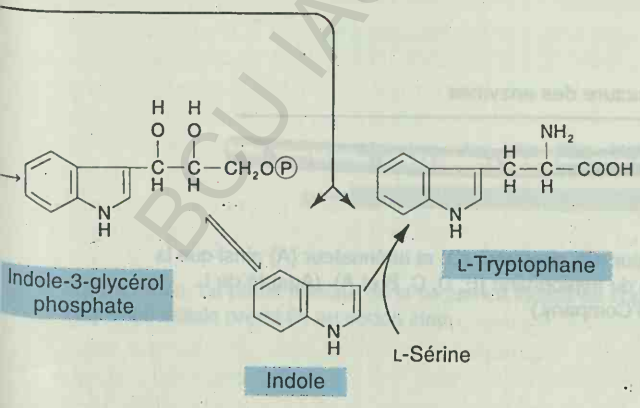


Figure 18-22. La séquence génétique des cistrons de l'opéron *trp* d'*E. coli* et la séquence des réactions catalysées par les enzymes produites par les gènes de structure *trp*. Les produits des gènes *trpD* et *trpE* forment un complexe qui catalyse la première étape de la biosynthèse du tryptophane ; de même, les produits des gènes *trpB* et *trpA* s'agrègent pour former la tryptophane synthétase, une enzyme tétramérique qui catalyse un processus en deux étapes menant à la formation du tryptophane. (PRPP = phosphoribosylpyrophosphate ; CDRP = 1-(o-carboxyphénylamino)-1-désoxyribulose 5-phosphate.) (De S. Tanemura et R. H. Bauerle, *Genetics* 95, 1980, 545-559).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

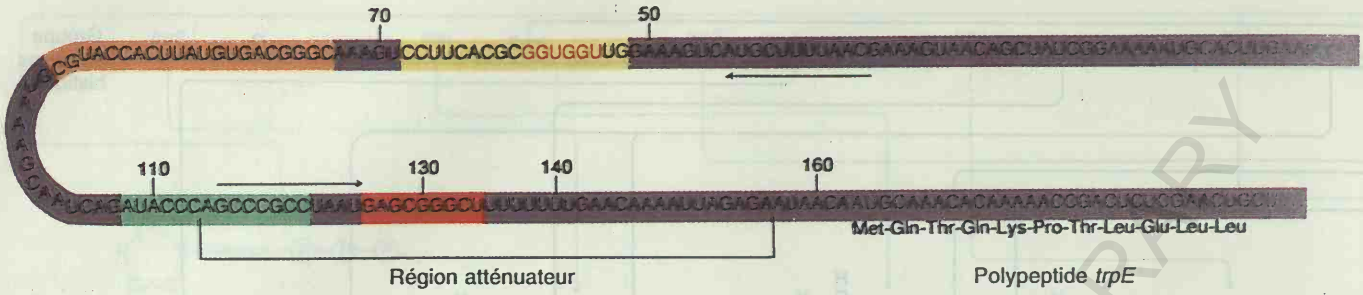


Figure 18-23. La séquence initiale de l'opéron *trp*, avec le segment atténuateur et le début de la séquence du gène de structure *trpE* (montrant le début de la séquence d'acides aminés du polypeptide *trpE*). Pour la clarté, les teintes utilisées pour les divers segments sont répétées dans les figures 18-25 et 18-26. (Modifié d'après G. S. Stent et R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2ième éd. Copyright ©1978 by W. H. Freeman and Company. Basé sur des données non publiées fournies par Charles Yanofsky.)

Un tel système de régulation a été mis en évidence pour le groupe des gènes qui contrôlent les enzymes de la biosynthèse du tryptophane. Cette synthèse est mise à l'arrêt lorsqu'un excès de tryptophane est présent dans le milieu de culture. Jacob et Monod suggérèrent que le groupe des cinq cistrons *trp* d'*E. coli* différait de l'opéron *lac* en ce que le répresseur du tryptophane ne se liait à l'opérateur *trp* qu'après avoir fixé le tryptophane (figure 18-22). Souvenez-vous que c'est au contraire lorsqu'il a lié le lactose que le répresseur *lac* ne s'attache plus à l'opérateur. Un deuxième mécanisme de contrôle module la biosynthèse du tryptophane au niveau de l'activité enzymatique. Il s'agit de la **rétroinhibition** («feedback inhibition»). Dans le cas présent, c'est l'activité de la première enzyme de la voie, codée par les gènes *trpE* et *D*, qui est inhibée par le tryptophane lui-même.

Comme pour l'opéron *lac*, une analyse plus poussée de l'opéron *trp* révéla l'existence d'un niveau de contrôle supplémentaire qui se superposait à l'interaction répresseur-opérateur. En étudiant des mutants constitutifs (porteurs d'une mutation dans le locus *trpR* du répresseur) qui continuent à produire l'ARNm *trp* en présence de tryptophane, Yanofsky montra que l'élimination du tryptophane du milieu de culture augmentait de dix fois la production d'ARNm *trp* dans ces souches, bien que le répresseur Trp fût inactif et qu'il ne fût pas possible d'expliquer cette augmentation par une dérépression normale liée à un abaissement du niveau cellulaire de tryptophane. De plus, Yanofsky identifia la région responsable de cette augmentation en isolant un mutant constitutif capable de produire l'ARNm *trp* à ce taux maximal dix fois plus élevé, même en présence de tryptophane, et établit qu'il portait une délétion située entre l'opérateur et le cistron *trpE* (voir la carte de la figure 18-22).

Yanofsky réussit à isoler l'ARNm polycistronique de l'opéron *trp*. En déterminant sa séquence, il trouva à son extrémité 5' une séquence longue de 160 bases, appelée **séquence initiale** («leader sequence») qui précédait le premier codon du gène *trpE*. Le mutant qui produisait de manière permanente l'ARNm de *trp* au taux maximal comportait une délétion qui s'étendait de la position 130 à la position 160 (figure 18-23). Yanofsky appela la région inactivée par cette délétion la région **atténuateur** puisqu'elle était responsable d'une réduction de la vitesse de synthèse de l'ARNm lorsque le tryptophane est présent. La figure 18-24 montre la position de ces éléments dans l'opéron *trp*. Mais quel était le rôle du segment 1 à 130 de la séquence initiale ? Une observation étonnante apporta la réponse à cette question.

En étudiant la production des ARNm de l'opéron *trp* (dans des mutants *trp*$^-$), Yanofsky constata que, même en présence de concentrations élevées de tryptophane qui auraient dû réduire le taux de transcription d'un facteur de dix par atténuation, les 141 premières bases de la séquence leader étaient toujours transcrites à la fréquence maximale ; par contre, la synthèse des ARNm correspondant à la totalité de l'opéron n'avait lieu, comme prévu, qu'à une fréquence dix fois moindre. En d'autres mots, même en présence de concentrations élevées de tryptophane, ces 141 premières bases de l'opéron

Figure 18-24. Schéma de l'opéron tryptophane montrant les sites promoteur (P), opérateur (O) et atténuateur (A) ainsi que la séquence leader et les gènes codant pour les enzymes de la biosynthèse du tryptophane (E, D, C, B et A). (Adapté de L. Stryer, *Biochemistry*, 4ième éd. Copyright © 1995 par W. H. Freeman and Company.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

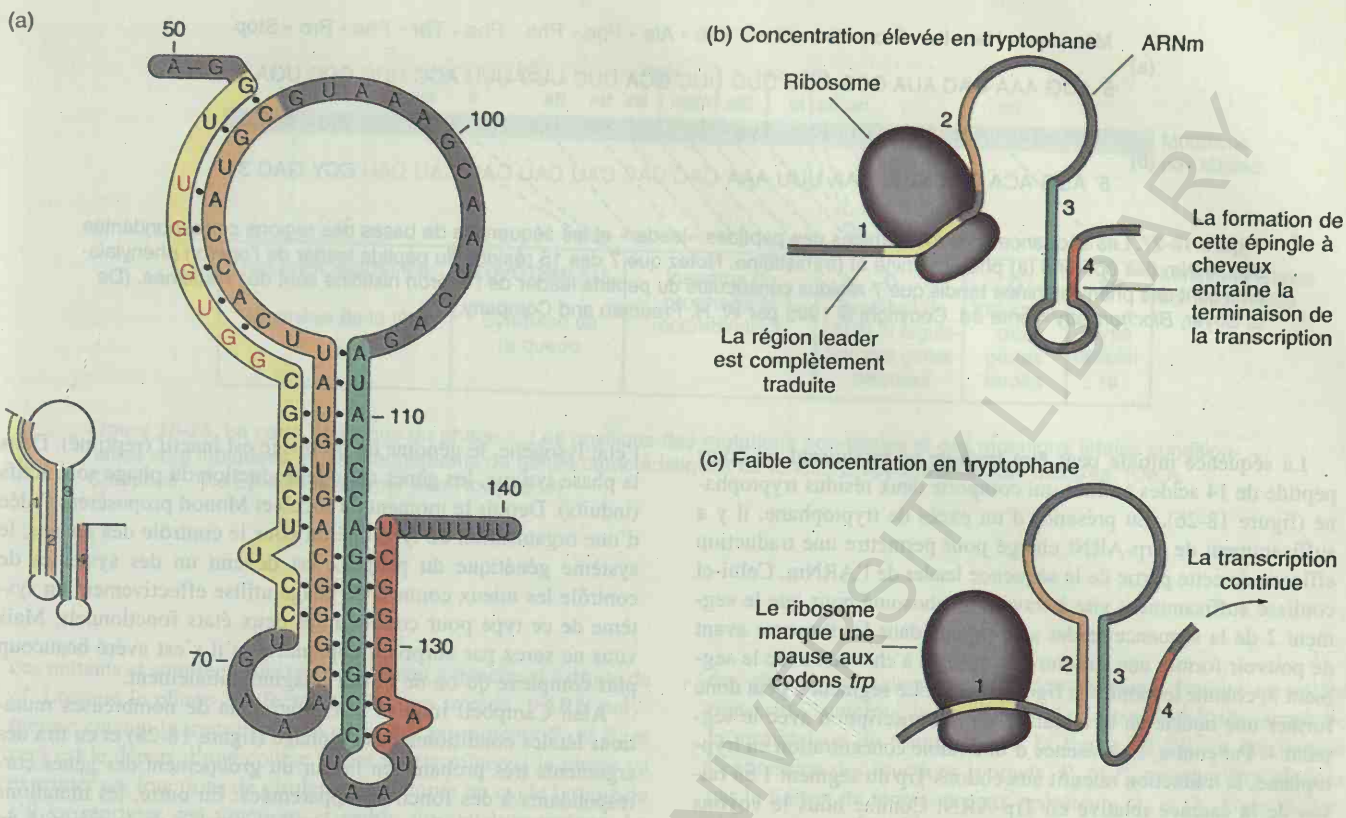


Figure 18-25. Modèle de l'atténuation de l'opéron *trp*. (a) Structures secondaires proposées pour la séquence initiale (leader) de l'ARNm *trp* d'*E. coli*. Quatre régions peuvent s'apparier pour former trois structures en épingle à cheveux. (b) Lorsque le tryptophane est présent à une concentration élevée, le segment 1 de l'ARNm *trp* est traduit activement et le segment 2 (bien qu'il ne soit pas traduit) est masqué par le ribosome ce qui permet aux segments 3 et 4 de s'apparier. L'épingle à cheveux ainsi formée indique de manière ou d'autre à l'ARN polymérase d'interrompre la transcription. (c) Par contre, en condition de carence en tryptophane, le ribosome marque une pause au niveau des deux codons *trp* présents dans le segment 1. Le segment 2 interagit avec le segment 3 au lieu d'être entraîné dans le ribosome et les segments 3 et 4 ne peuvent donc pas s'apparier. La transcription peut par conséquent se poursuivre.(D'après D. L. Oxender, G. Zurawski et C. Yanofsky, *Proc. Natl. Acad.Sci.* 76, 1979, 5524.)

sont transcrites au taux maximal mais, en raison d'un mécanisme d'atténuation, la transcription ne se poursuit au delà de cette région que dans 1 un cas sur 10. Ceci suggère que l'extrémité de l'atténuateur agit comme un terminateur qui, en présence de tryptophane, arrête la transcription dans 9 cas sur 10. En absence de tryptophane, cet atténuateur est inactivé et chaque transcription entamée passe outre à la région atténuateur et se poursuit jusqu'à l'extrémité de l'opéron, d'où l'augmentation d'un facteur de dix. Dans les mutants *trp*⁻ dont la région atténuateur est délétée, il n'y a aucun obstacle à l'élongation de l'ARNm et la transcription passe outre dans tous les cas (c'est-à-dire que le taux de production maximal est atteint), que le tryptophane soit présent ou non.

Qu'est-ce qui cause cette interférence avec la terminaison de la transcription au niveau de l'atténuateur en absence de tryptophane ? La figure 18-25 présente un modèle fondé sur les structures secondaires possibles de l'ARNm dans la région leader. Le modèle propose qu'une des conformations favorise la terminaison de la transcription alors que l'autre favorise l'élongation. La traduction d'une partie de la séquence initiale susciterait l'élaboration d'une conformation favorable à la terminaison.

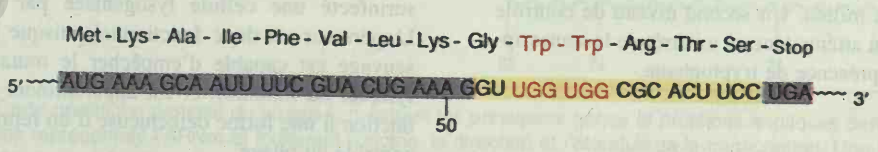


Figure 18-26. La partie traduite de la séquence initiale de l'opéron *trp*, avec la séquence correspondante de l'ARNm. La traduction de la séquence initiale prend fin au codon stop.

BCU IASI - THE UNIVERSITY LIBRARY

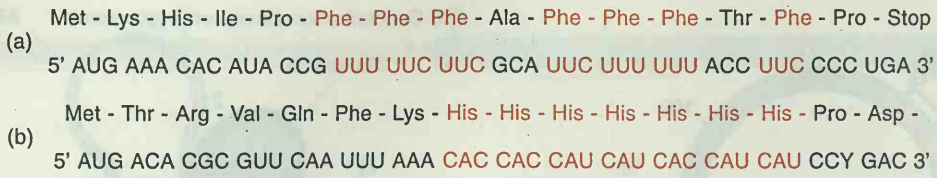


Figure 18-27. Les séquences d'acides aminés des peptides «leader» et les séquences de bases des régions correspondantes des ARNm des opérons (a) phenylalanine et (b) histidine. Notez que 7 des 15 résidus du peptide leader de l'opéron phénylalanine sont des phénylalanines tandis que 7 résidus consécutifs du peptide leader de l'opéron histidine sont des histidines. (De L. Stryer, *Biochemistry* 4ième éd. Copyright © 1995 par W. H. Freeman and Company.)

La séquence initiale peut être traduite en produisant un court peptide de 14 acides aminés qui comporte deux résidus tryptophane (figure 18-26). En présence d'un excès de tryptophane, il y a suffisamment de Trp-ARNt chargé pour permettre une traduction efficace de cette partie de la séquence leader de l'ARNm. Celui-ci coulisse suffisamment vite à travers le ribosome pour que le segment 2 de la séquence leader soit engagé dans le ribosome avant de pouvoir former une structure en épingle à cheveux avec le segment 3, comme le montre la figure 18-25b. Le segment 3 peut donc former une boucle de terminaison de la transcription avec le segment 4. Par contre, en présence d'une faible concentration en tryptophane, la traduction ralentit aux codons Trp du segment 1 en raison de la carence relative en Trp-ARNt Comme nous le voyons dans la figure 18-25c, ceci permet la formation d'une épingle à cheveux entre les segments 2 et 3, empêchant ainsi celle de la boucle de terminaison de la transcription entre les segments 3 et 4. La transcription n'est donc pas arrêtée par l'atténuateur aux faibles concentrations en tryptophane. De cette manière, une variation supplémentaire d'un facteur 10 du taux des enzymes de la biosynthèse du tryptophane s'ajoute à l'écart normalement permis sur la base de l'interaction répresseur-opérateur. L'analyse de nombreuses mutations ponctuelles qui touchaient la séquence leader et se montraient favorables ou défavorables à la formation des différentes structures secondaires possibles de l'ARNm fournit d'autres arguments en faveur du modèle d'atténuation de Yanofsky.

Plusieurs opérons biosynthétiques possèdent des mécanismes d'atténuation comparables à celui du tryptophane (figure 18-27). Par exemple, la région leader de l'opéron *his* qui code pour les enzymes de la voie de biosynthèse de l'histidine contient une région traduite comportant sept codons histidine consécutifs. Les mutations à des loci extérieurs à l'opéron qui aboutissent à une réduction de la concentration d'his-ARNt chargé mènent à une synthèse partiellement constitutive des enzymes codées par l'opéron *his*.

Message L'opéron *trp* est soumis à une régulation négative par un système opérateur-répresseur qui réprime la synthèse des enzymes de la biosynthèse du tryptophane lorsque celui-ci est présent dans le milieu. Un second niveau de contrôle existe avec une région atténuateur où un arrêt de la transcription est induit par la présence de tryptophane.

Le phage λ : une association d'opérons

Lorsqu'ils proposèrent le modèle de l'opéron, Jacob et Monod suggérèrent que l'activité génétique des phages tempérés pouvait être contrôlée par un système analogue à celui de l'opéron *lac*. A l'état lysogène, le génome du prophage est inactif (réprimé). Dans la phase lytique, les gènes de la reproduction du phage sont actifs (induits). Depuis le moment où Jacob et Monod proposèrent l'idée d'une organisation de type opéron pour le contrôle des phages, le système génétique du phage λ est devenu un des systèmes de contrôle les mieux connus. Ce phage utilise effectivement un système de ce type pour contrôler ses deux états fonctionnels. Mais vous ne serez pas surpris d'apprendre qu'il s'est avéré beaucoup plus complexe qu'on ne l'avait imaginé initialement.

Alan Campbell induisit et cartographia de nombreuses mutations létales conditionnelles du phage (figure 18-28) et en tira des arguments très probants en faveur du groupement des gènes correspondants à des fonctions apparentées. En outre, les mutations des gènes *N*, *O* et *P* empêchaient l'expression de la majorité du génome après l'infection phagique, seuls les loci situés entre *N* et *O* étant actifs. Nous verrons bientôt la signification de cette observation.

Lorsque des cellules normales sont infectées par des particules de phages λ de type sauvage, deux séquences d'événements peuvent se produire : (1) un phage peut être intégré dans le chromosome bactérien sous forme d'un prophage inerte (qui lysogénise donc la bactérie) ou (2) le phage peut produire les enzymes dont il a besoin pour orienter la cellule vers la production des éléments nécessaires à sa maturation et à la lyse de la cellule. Lorsque des particules de phages sauvages sont étalées sur un tapis de bactéries sensibles, des zones claires (ou plages de lyse) apparaissent là où des cellules bactériennes sont infectées et lysées, mais ces plages sont troubles parce que des bactéries lysogènes (qui résistent à la surinfection phagique) s'y développent aussi.

Des mutants de phages qui forment des plages claires parce qu'ils ne peuvent plus lysogéniser les cellules peuvent être sélectionnés. Ces mutants *claires* (*c*) se montrent analogues aux mutants *I* et *O* d'*E. coli*. Les mutants conditionnels pour un site dénommé *cI*, par exemple, sont incapables d'établir un état lysogénique dans les conditions restrictives, suggérant que soit le répresseur, soit le site de liaison du répresseur (opérateur) est défectueux. Toutefois, ces mutants sont également incapables d'induire la lyse après avoir surinfecté une cellule lysogénisée par un prophage sauvage. L'opérateur est donc fonctionnel puisque le répresseur du phage sauvage est capable d'empêcher le mutant d'entamer un cycle lytique. La mutation *cI* est apparemment responsable de la production d'une forme défectueuse d'un répresseur impliqué dans le contrôle du phage.

Des mutants virulents qui ne lysogénisent pas les cellules mais se reproduisent et entament un cycle lytique après avoir surinfecté une cellule lysogénisée ont été isolés. Ces mutants sont donc insensibles au répresseur de λ. La cartographie génétique a mis en évidence *deux* opérateurs appelés O_L et O_R qui sont altérés chez

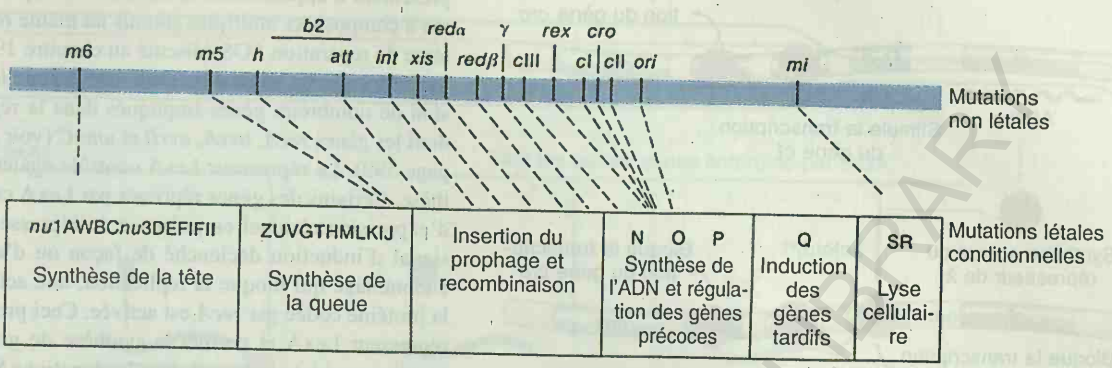


Figure 18-28. La carte génétique du phage λ. Les positions des mutations non-létales et des mutations létales conditionnelles sont indiquées et les groupements de gènes caractéristiques de fonctions apparentées sont montrés. (De A. Campbell, *The Episomes*, Harper and Row, 1969).

ces mutants et sont localisés respectivement à gauche et à droite de *cI*. Lorsque le phage λ infecte un hôte non immun, l'ARN polymérase entame la transcription à partir des promoteurs P_L et P_R et ceci est le départ d'une course visant à déterminer si le phage va exprimer ses fonctions de virulence et entamer un cycle lytique ou s'il va réprimer ces fonctions et établir un état lysogénique. La figure 18-29 montre une partie de la carte génétique de λ avec la dimension de certains de ses transrits. P_L commande le transcrit orienté vers la gauche qui code pour la protéine antiterminatrice N et pour diverses autres fonctions lytiques. P_R commande le transcrit de droite qui couvre entre autres les gènes *cro*, *cII* et *Q*. Ces transcrits se terminent normalement à des points précis, avant que des gènes nécessaires pour le développement lytique ne soient transcrits. Toutefois, la protéine N si elle est synthétisée, empêche la terminaison du transcrit (voir la figure 18-29), ce qui permet l'expression des fonctions lytiques. P_L et P_R peuvent être bloqués par la liaison du répresseur aux opérateurs O_R et O_L. Dans ce dernier cas, la synthèse de la protéine N est interdite et l'allongement des transcrits formés à partir de P_L et P_R est donc impossible.

Le point critique dans l'établissement de la lysogénie est la synthèse du répresseur de λ, codé par le gène *cI*. Le gène *cI* possède deux promoteurs. L'un, P_E, pour l'établissement de la lysogénie, et le second, P_M, pour son maintien. Les transcriptions qui débutent à chacun de ces promoteurs exigent une protéine activatrice. Pour

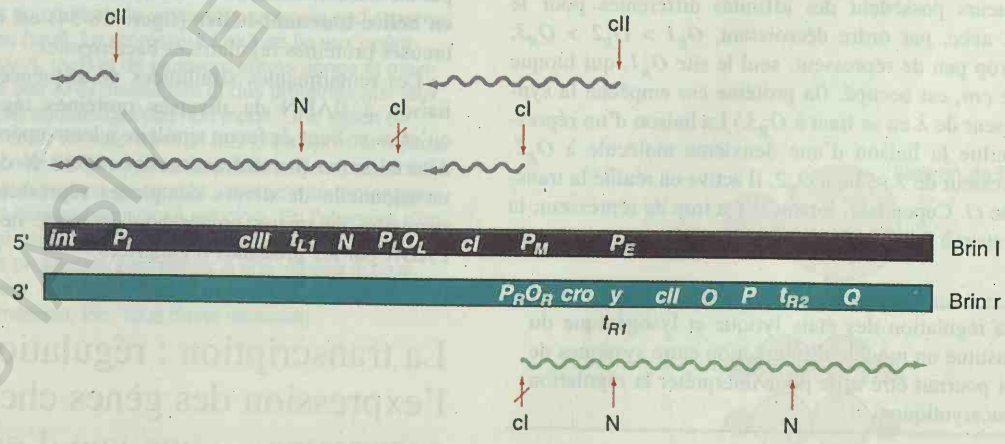


Figure 18-29. Carte génétique partielle du phage λ, montrant les principaux gènes et protéines impliqués dans la régulation. Les traits ondulés représentent l'ARNm et indiquent l'origine, la direction et l'étendue de la transcription. Une flèche verticale au *début* d'un ARNm marque le site où le produit du gène indiqué active un promoteur. Si la flèche est barrée, le produit de ce gène réprime la transcription. Lorsqu'une flèche marque un site à l'*intérieur* d'un ARNm, le produit du gène indiqué empêche la terminaison de la transcription à ce site. Le site t_{L1} est un terminateur potentiel pour P_L tandis que t_{R1} est un terminateur potentiel pour P_R, lorsqu'ils sont soumis à l'action de N, comme l'indique le diagramme. (Adapté de D. Wulf et M. Rosenberg, dans R. W. Hendrickx et al., édit., *Lambda II*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1983.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

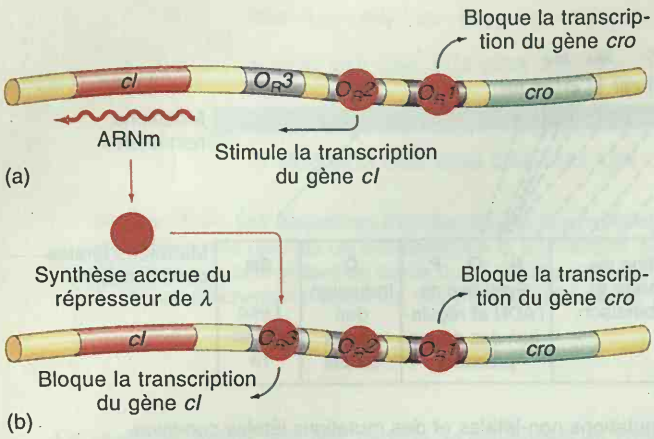


Figure 18-30. L'autorégulation de la synthèse du répresseur cI (a) La liaison du répresseur cI à O_R1 réprime la transcription de *cro* et en même temps facilite la liaison d'une molécule de cI à O_R2, ce qui a pour effet de stimuler la synthèse de ce répresseur cI. (b) Lorsque la concentration du répresseur cI atteint un niveau élevé, le troisième site, O_R3, est lié par le répresseur cI. Comme celui-ci recouvre le promoteur *cI*, toute synthèse supplémentaire du répresseur cI est bloquée jusqu'à ce que son niveau diminue et que le site O_R3 soit à nouveau libre. (Adapté de L. Stryer, *Biochemistry*, 4ième éd. Copyright © 1995 par W. H. Freeman and Company.)

PM, il s'agit du répresseur codé par *cI* lui-même (voir ci-dessous). Pour synthétiser le répresseur dans une cellule où aucun répresseur n'existe encore, il est donc nécessaire d'utiliser $P_{E..}$ Or, P_E est activé par le produit de *cII*. Donc, *cII* doit être transcrit pour permettre l'établissement de la lysogénie. Un protéine supplémentaire est requise à cet effet, l'*intégrase* codée par *int*. Le gène *int* est transcrit à partir de son propre promoteur, P_I (figure 18-29), qui est aussi nécessaire pour l'activation par le produit du gène *cII*.

A l'état lysogénique, le répresseur de λ contrôle sa propre synthèse à partir du promoteur P_M en interagissant avec trois opérateurs, O_R1, O_R2 et O_R3 comme le montre le schéma de la figure 18-30. Ces opérateurs possèdent des affinités différentes pour le récepteur de λ avec, par ordre décroissant, $O_R1 > O_R2 > O_R3$. Lorsqu'il y a trop peu de répresseur, seul le site O_R1, qui bloque l'expression de *cro*, est occupé. (la protéine *cro* empêche la synthèse du répresseur de λ en se liant à O_R3.) La liaison d'un répresseur à O_R1 facilite la liaison d'une deuxième molécule à O_R2. Lorsque le répresseur de λ se lie à O_R2, il active en réalité la transcription du gène *cI*. Cependant, lorsqu'il y a trop de répresseur, la liaison à l'opérateur à faible affinité O_R3 bloque la transcription du gène *cI*.

Message La régulation des états lytique et lysogénique du phage λ constitue un modèle d'interaction entre systèmes de contrôle qui pourrait être utile pour interpréter la régulation des gènes eucaryotiques.

La répression d'opérons multiples

Certains répresseurs peuvent contrôler plusieurs et même un grand nombre d'opérons simultanément. Le répresseur Trp, par exemple, contrôle simultanément l'opéron *trp*, le gène *aroH* et le gène du répresseur *trp* lui-même. Les trois opérateurs respectifs présentent d'appréciables similitudes de séquence. Un autre système à composants multiples soumis au même répresseur est le système de réparation SOS (discuté au chapitre 19 en relation avec la mutagénèse). Un répresseur codé par le gène *lexA* réduit l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, dont les gènes *recA*, *uvrA*, *uvrB* et *umuC* (voir la figure 18-31 et la page 599). Le répresseur LexA contrôle également sa propre synthèse. Certains des gènes réprimés par LexA conservent un niveau d'expression résiduel en présence du répresseur. En réponse à un signal d'induction déclenché de façon ou d'autre par de l'ADN endommagé qui bloque la réplication, une activité protéasique de la protéine codée par *recA* est activée. Ceci provoque le clivage du répresseur LexA et permet la synthèse de grandes quantités des protéines qui interviennent dans les fonctions SOS. La lumière UV et d'autres agents qui endommagent l'ADN induisent la réponse SOS. Fait intéressant, la protéase RecA clive également le répresseur de λ (le produit du gène λ *cI*), ainsi que les répresseurs de plusieurs autres phages apparentés à λ. Ceci constitue la base physique de la classique induction par les rayons UV des bactéries lysogènes pour λ.

La structure des protéines régulatrices

La comparaison des séquences et l'analyse des structures d'un certain nombre de protéines qui se lient à l'ADN indiquent qu'elles possèdent des propriétés communes. Beaucoup comportent un domaine de liaison à l'ADN qui est localisé à une extrémité de la chaîne polypeptidique et fait saillie dans la partie principale de la protéine. Dans certains cas, cette portion principale de la protéine contient également le site de liaison de l'inducteur. Cet agencement (figure 18-32) vaut pour les répresseurs Lac, λ *cI* et λ Cro aussi bien que pour la protéine CAP.

On a fait l'hypothèse que les hélices α qui font saillie se placent dans le sillon majeur de l'ADN. La figure 18-33 présente un modèle du complexe opérateur-répresseur du système *lac*. Deux hélices α du répresseur interagissent avec deux sillons majeurs consécutifs de l'ADN du site opérateur. Les hélices sont liées entre elles par un tournant de la structure secondaire de la protéine. Ce **motif en hélice-tournant-hélice** (figure 18-34) est commun à de nombreuses protéines régulatrices bactériennes.

Les remarquables similitudes de séquences des domaines de liaison à l'ADN de diverses protéines régulatrices suggèrent qu'elles se lient de façon similaire à leurs opérateurs respectifs. La détermination par diffraction des rayons X de la structure tridimensionnelle de divers complexes répresseur-opérateur devrait permettre de mieux comprendre le mode de reconnaissance de l'ADN par les protéines régulatrices.

La transcription : régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes — une vue d'ensemble

L'activation de gènes spécifiques joue un rôle clé dans le développement embryonnaire et la différenciation tissulaire des eucaryotes supérieurs. Souvent la mise en marche ou l'arrêt de groupes de gènes est irréversible, contrairement à ce qui se passe chez les bactéries où l'activité des gènes est modulée de manière continue en réponse aux conditions physiologiques. Il existe cependant des

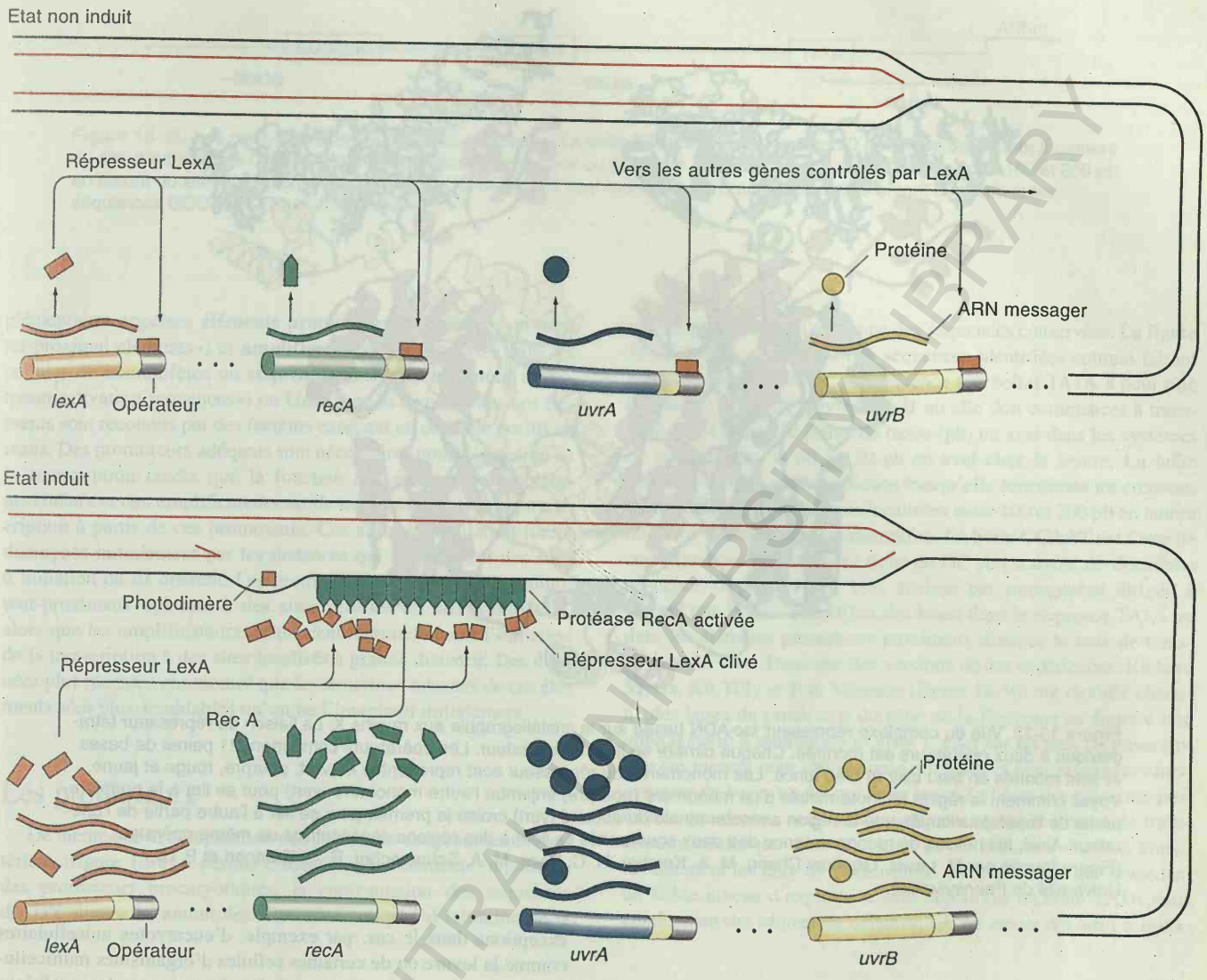


Figure 18-31. Le système de régulation basé sur LexA et RecA. Ce système est au repos au cours de la croissance normale en l'absence de lésion de l'ADN (*en haut*). Le répresseur LexA se lie aux opérateurs de *lexA, recA, uvrA, uvrB* et de plusieurs autres gènes et maintient ainsi la synthèse des ARN messagers et des protéines aux taux réduits qui sont caractéristiques de l'état non induit. Une lésion de l'ADN suffisante pour créer un vide dans un des brins après la réplication déclenche la réponse SOS (*en bas*). La protéine RecA se lie à l'ADN à simple brin situé en face de ce vide ; son activité protéasique est dès lors activée et le répresseur LexA est clivé. En l'absence d'un répresseur fonctionnel, les gènes contrôlés par LexA sont mis en route et leurs produits protéiques synthétisés à une vitesse accrue. (De P. Howard-Flanders, «Inducible Repair of DNA». Copyright © 1981 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés).

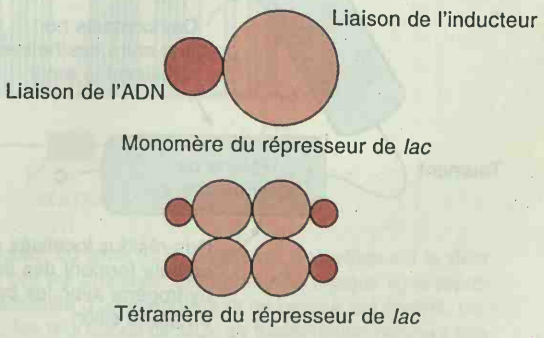


Figure 18-32. Représentation schématique de l'arrangement des domaines dans le répresseur de l'opéron *lac*. Toutes les mutations qui affectent l'ADN et la liaison à l'opérateur consistent en des altérations de l'extrémité amino-terminale de la protéine tandis que les mutations entraînant des défauts de la liaison de l'inducteur ou de l'agrégation des sous-unités du répresseur touchent le reste de cette protéine.

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

Figure 18-33. Vue du complexe répresseur *lac*-ADN basée sur la cristallographie aux rayons X. La liaison du répresseur tétramérique à deux opérateurs est montrée. Chaque dimère se lie à un opérateur. Les opérateurs comportent 21 paires de bases et sont montrés en bleu clair et bleu foncé. Les monomères du répresseur sont représentés en vert, pourpre, rouge et jaune. Voyez comment la région aminoterminale d'un monomère (pourpre) enjambe l'autre monomère (vert) pour se lier à la première partie de l'opérateur tandis que la région aminoterminale du second (vert) croise le premier pour se lier à l'autre partie de l'opérateur. Ainsi, les hélices de reconnaissance des deux sous-unités se lient à des régions consécutives du même opérateur. (Figure fournie par M. Lewis, Geoffrey Chang, M. A. Kercher, H. C. Pace, M. A. Schumacher, R. G. Brennan et P. Lu, Université de Pennsylvanie).

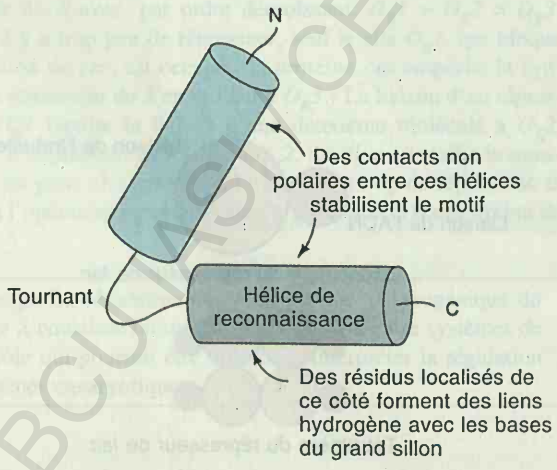


Figure 18-34. Motif en hélice-tournant-hélice des protéines se liant à l'ADN. Chaque monomère de ces protéines dimériques contient un motif hélice-tournant-hélice ; les deux sous-unités sont séparées de 34 Å — le pas de l'hélice d'ADN. (De L. Stryer, *Biochemistry*, 4ième éd. Copyright © 1995 par W. H. Freeman and Company.)

exceptions dans le cas, par exemple, d'eucaryotes unicellulaires comme la levure ou de certaines cellules d'organismes multicellulaires qui sont capables de réagir à des changements des conditions de l'environnement. C'est le cas des cellules hépatiques qui induisent la synthèse de certaines enzymes de détoxication en présence de certaines substances chimiques (voir à la page 602).

La plupart des gènes eucaryotiques sont régulés au niveau de la transcription et les mécanismes impliqués sont similaires à ceux qui sont connus chez les bactéries en ce sens que des facteurs cytoplasmiques, ou **facteurs agissant en trans,** interagissent avec des sites de contrôle, ou **séquences agissant en cis,** sur l'ADN. Toutefois, ces mécanismes sont souvent plus compliqués sur le plan des détails. Les sites de régulation peuvent être localisés loin des sites d'initiation de la transcription sur l'ADN et toute une batterie de facteurs est parfois nécessaire pour atteindre l'activation maximale de certains gènes.

Le contrôle en cis de la transcription

Ainsi que nous l'avons vu au chapitre 13, il y a trois ARN polymérases différentes dans les systèmes eucaryotiques. Toutes les molécules d'ARNm sont synthétisées par l'ARN polymérase II. Pour atteindre son taux de transcription maximal, l'ARN polymérase II exige la présence de plusieurs types de séquences régulatrices agissant en *cis* : les promoteurs ainsi que des séquences sup-

BCU LAUSANNE CENTRALE UNIVERSITAIRE LIBRARY

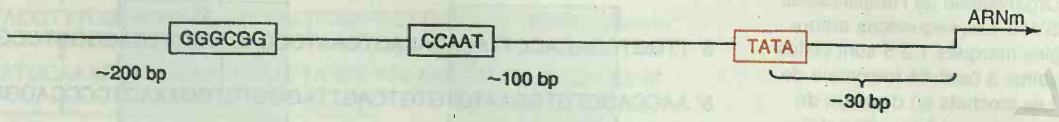


Figure 18-35. Les promoteurs des eucaryotes supérieurs. La boîte TATA est située environ 30 paires de bases (pb) en amont du site d'initiation de l'ARNm. On trouve habituellement deux ou plusieurs éléments promoteur-proximaux entre 100 et 200 pb en amont du site d'initiation. Les séquences CCAAT et GC sont montrées ici. D'autres éléments amont comportent les séquences GCCACACCC et ATGCAAAT.

plémentaires appelées **éléments promoteur-proximaux** («promoter-proximal elements») et **amplificateurs** («enhancers») dans les cellules de mammifères ou **séquences activatrices amont** («upstream activating sequences») ou **UAS** chez la levure. Tous ces éléments sont reconnus par des facteurs exerçant un contrôle positif en *trans*. Des promoteurs adéquats sont nécessaires pour l'initiation de la transcription tandis que la fonction des éléments promoteur-proximaux et des amplificateurs est de maximiser le taux de transcription à partir de ces promoteurs. Ces sites de régulation furent distingués initialement par les distances qui les séparent des sites d'initiation où ils opèrent. Les promoteurs et les éléments promoteur-proximaux agissent à des sites proches du site d'initiation, alors que les amplificateurs influencent habituellement l'initiation de la transcription à des sites localisés à grande distance. Des données plus récentes ont montré que les structures internes de ces éléments sont plus semblables qu'on ne l'imaginait initialement.

Les promoteurs

De même que la comparaison des séquences des promoteurs bactériens (figure 13-8) a permis d'identifier les éléments importants des promoteurs procaryotiques, la confrontation des séquences d'ADN situées en amont des sites eucaryotiques d'initiation de la transcription a mis en évidence des séquences conservées. La figure 18-35 montre un schéma des séquences identifiées comme faisant partie de ces promoteurs. La séquence (ou boîte) **TATA** a pour rôle d'indiquer à l'ARN polymérase II où elle doit commencer à transcrire, c'est-à-dire 30 paires de bases (pb) en aval dans les systèmes de mammifères, et 60 à 120 pb en aval chez la levure. La boîte TATA se montre la plus efficace lorsqu'elle fonctionne en conjonction avec d'autres séquences localisées entre 100 et 200 pb en amont du site d'initiation de la transcription. La boîte **CCAAT** est l'une de ces séquences ; un segment riche en GC sert souvent de deuxième séquence (figure 18-35). Une analyse par mutagénèse dirigée a montré que le fait de modifier des bases dans la séquence TATA ou dans les éléments promoteurs proximaux diminue le taux de transcription in vivo. Dans une des versions de ces expériences, Richard Myers, Kit Tilly et Tom Maniatis (figure 18-36) ont modifié chacune des bases du promoteur du gène de la β-globine au cours d'une «mutagénèse à saturation» in vivo. L'effet sur les taux de transcription fut mesuré pour chaque base modifiée et montra que les changements de bases en dehors de la boîte TATA et des éléments promoteur-proximaux sont sans conséquence pour le niveau de transcription tandis que toute altération de ces éléments diminue considérablement les taux de transcription. Certains gènes qui possèdent un faible niveau d'expression sont dépourvus de boîte TATA mais contiennent des séquences riches en GC en amont des sites d'initia-

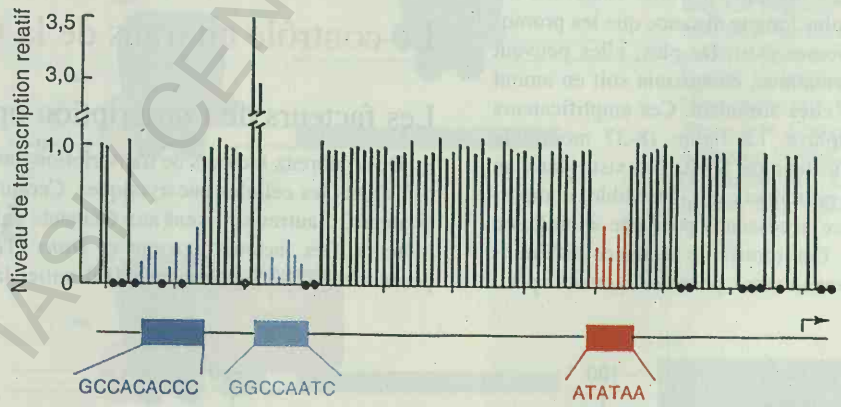


Figure 18-36. Les conséquences de mutations ponctuelles dans le promoteur du gène de la β–globine. Les effets sur la vitesse de transcription de mutations ponctuelles dans la région du promoteur ont été analysés. La hauteur de chaque ligne représente le taux de transcription, rapporté à celui du promoteur sauvage, qui résulte d'un changement de base à cet endroit. Un niveau de 1,0 signifie que le taux est égal à celui du promoteur sauvage ; les réductions de taux de transcription donnent des valeurs inférieures à 1,0. Presque tous les nucléotides du promoteur ont été testés, sauf ceux qui sont indiqués par des points noirs. Le schéma présenté sous le graphique montre les positions de la boîte TATA et des deux éléments promoteur-proximaux. Seules les substitutions de bases qui affectent un des trois éléments du promoteur changent le niveau de transcription. (De T. Maniatis, S. Goodburn et J. A. Fisher, *Science* 236, 1987, 1237-1245.)

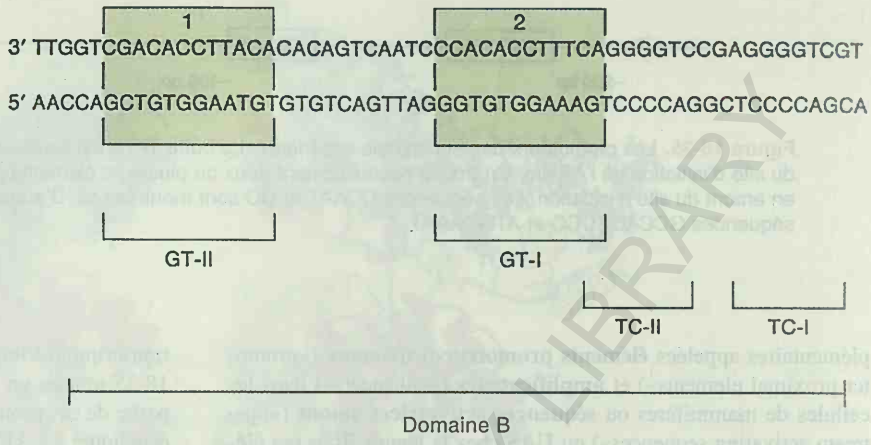


Figure 18-37. Organisation de l'amplificateur (enhancer) de SV40. Les séquences entourées de rectangles marqués 1 à 5 sont celles qui sont nécessaires à l'activité maximale de l'amplificateur. Les crochets en dessous de chaque séquence indiquent la position des motifs qui sont répétés dans l'amplificateur. Les domaines fonctionnels A et B sont indiqués au bas de la figure. (De T. Maniatis, S. Goodburn et J. A Fisher, *Science* 236, 1987, 1237-1245.)

tion de la transcription. Dans ce cas, la transcription débute à des sites différents mais proches.

Contrairement à leurs homologues procaryotiques, les promoteurs eucaryotiques ne contiennent pas suffisamment de signaux de reconnaissance pour permettre à l'ARN polymérase seule d'initier la transcription in vivo. La boîte TATA aussi bien que les séquences amont doivent être reconnues par des protéines régulatrices qui s'y lient et activent la transcription, probablement en permettant à leur tour à la polymérase de se lier et d'initier correctement la transcription. Plus loin, nous décrirons brièvement certains de ces facteurs qui agissent en *trans*.

Les amplificateurs

Les amplificateurs (enhancers) sont des séquences opérant en cis qui peuvent fortement accroître les taux de transcription à partir des promoteurs localisés sur la même molécule d'ADN. A certains égards, les amplificateurs rappellent les promoteurs. Ils sont notamment organisés en une série de séquences actives en *cis* qui sont reconnues par des facteurs opérant en *trans*. Toutefois, les amplificateurs peuvent agir à plus longue distance que les promoteurs, parfois jusqu'à 50 kilobases (kb). De plus, elles peuvent fonctionner dans les deux orientations, en agissant soit en amont soit en aval du promoteur qu'elles stimulent. Ces amplificateurs possèdent une structure complexe. La figure 18-37 montre la séquence d'ADN de l'amplificateur de SV40. Il existe dans un amplificateur deux domaines principaux qui, ensemble, comportent cinq éléments de séquence nécessaires pour une stimulation maximale de la transcription. Des motifs de séquence différents jouent le rôle de sites de reconnaissance pour des facteurs spécifiques opérant en *trans*. La figure 18-38 décrit l'organisation des éléments de contrôle de SV40. L'amplificateur augmente le taux de synthèse des ARNm précoces aussi bien que tardifs. Les séquences présentes à l'extrémité de l'amplificateur servent d'éléments amont pour le promoteur de l'ARNm tardif.

Une autre propriété intéressante des amplificateurs est d'être spécifiques de certains tissus, c'est-à dire d'agir dans certaines cellules mais pas dans d'autres. Les gènes d'anticorps, par exemple, sont flanqués de puissants amplificateurs qui n'opèrent que dans les cellules B du système immunitaire. D'autres amplificateurs réagissent à des signaux externes ; c'est le cas pour les gènes de la réponse au choc thermique («heat shock genes») qui s'expriment après un transfert à une température élevée ou pour les gènes des métallothionéines responsables de la détoxication des métaux lourds, qui sont induits en présence de cadmium ou de zinc. Certains amplificateurs sont stimulés par les hormones stéroïdes comme nous le verrons plus loin. Enfin, les amplificateurs sont des éléments importants pour l'expression différentielle des gènes des eucaryotes supérieurs, un point qui sera discuté au chapitre 25.

Le contrôle en trans de la transcription

Les facteurs de transcription opérant en trans

De nombreux facteurs de transcription ont maintenant été identifiés dans les cellules eucaryotiques. Certains se lient aux amplificateurs, d'autres se fixent aux éléments agissant en *cis* des promoteurs. Des facteurs agissant en *trans* (TAF) sont requis pour permettre à l'ARN polymérase II d'initier la transcription et for-

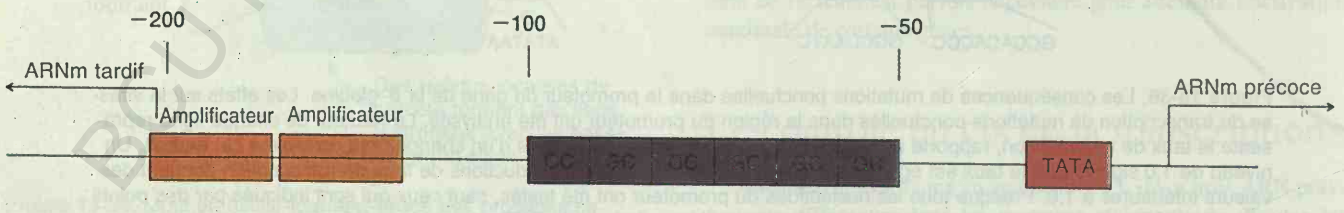


Figure 18-38. Les éléments du contrôle transcriptionnel de SV40. La séquence TATA, les éléments promoteur-proximaux (les séquences GC) et les deux amplificateurs sont nécessaires pour atteindre le taux maximal de synthèse de l'ARNm précoce. Les amplificateurs stimulent également la synthèse de l'ARNm tardif (Modifié d'après W. S. Dynan et R. Tijian, *Nature* 316, 1985, 774-777).

BCU IAC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

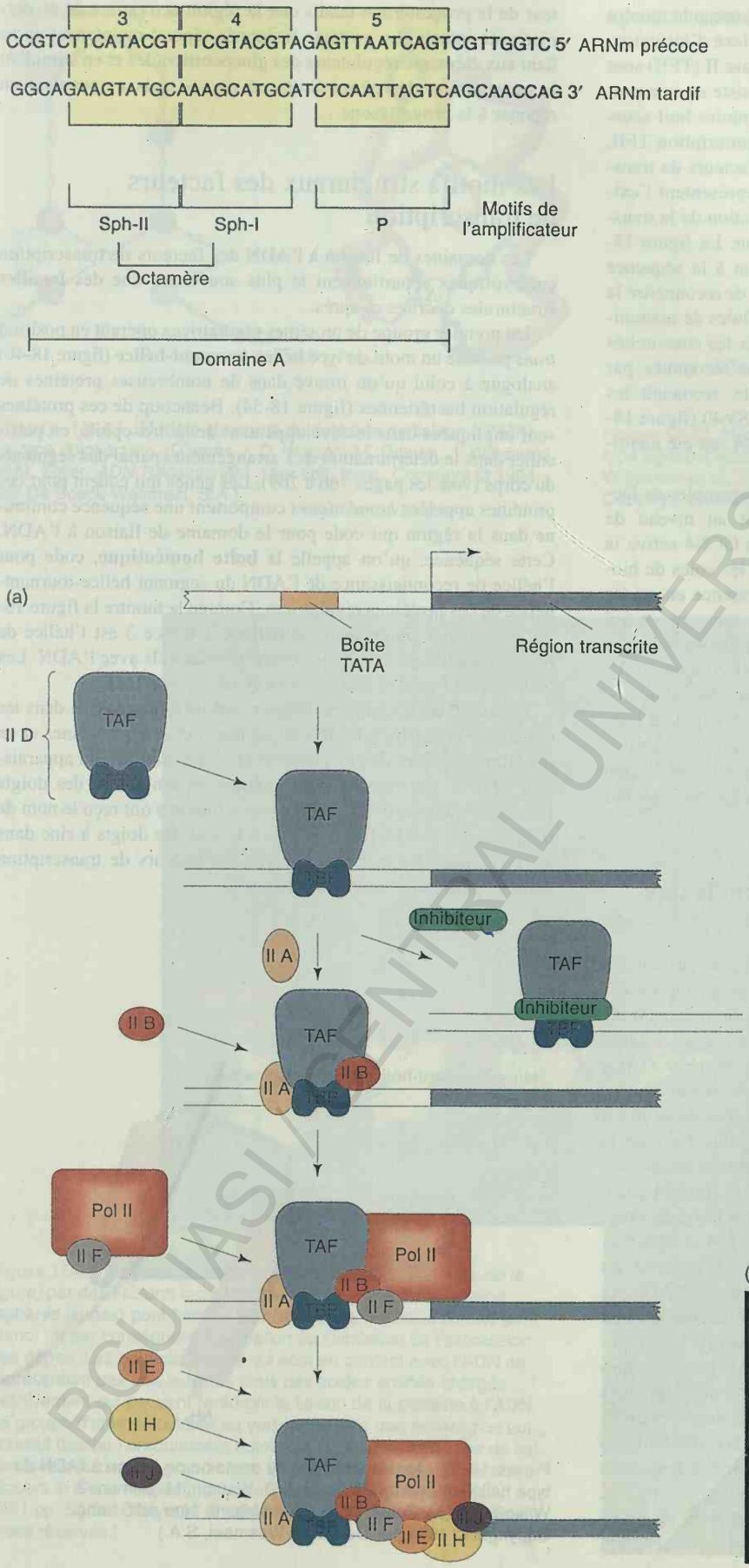
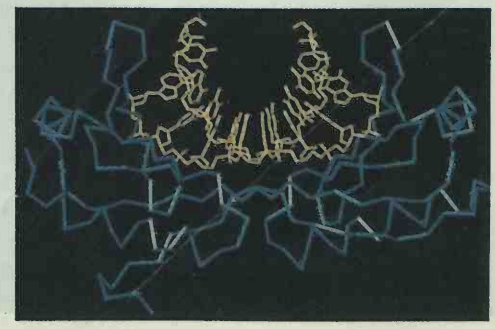


Figure 18-39. L'assemblage du complexe d'initiation de l'ARN polymérase II commence par la liaison de TFIID à la boîte TATA. TFIID est composé d'une sous-unité de liaison à la boîte TATA appelée TBP (en bleu foncé) et au moins huit autres sous-unités (TAF) représentées par un seul symbole carré (en bleu pâle). Des inhibiteurs (en vert) peuvent se lier au complexe TFIID-promoteur et empêcher la liaison d'autres facteurs de transcription généraux. La liaison de TFIIA au complexe TFII-promoteur (pour former le complexe D-A) empêche la liaison des inhibiteurs. TFIIB se lie ensuite au complexe D-A, liaison qui est suivie de celle d' un complexe préformé entre TFIIF et l'ARN polymérase II (en rouge). Enfin, les facteurs TFIIE, TFIIH et TFIIJ doivent s'ajouter au complexe dans l'ordre pour permettre l'initiation de la transcription. (b) La protéine de liaison à la boîte TATA (en bleu) est une molécule en forme de selle d'une remarquable symétrie. Sa partie inférieure chevauche l'ADN (en jaune)et semble lui donner une forme courbe. Cette courbure semble faciliter l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription. On suppose que les coactivateurs, qui ne sont pas représentés, se lient fermement à la partie supérieure de la protéine. (Partie a de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième édit. Copyright ©1995 par Scientific American Books ; partie b présentée grâce à l'amabilité de J. L. Kim et S. K. Berley, de *Nature*, 365, 1993, 520-527.)

(b)



BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ment avec celle-ci un complexe de préinitiation, comme le montre la figure 18-39a qui décrit l'assemblage du complexe d'initiation. Les facteurs de transcription pour l'ARN polymérase II (TFII) sont représentés par des lettres. Le facteur TFIID consiste en une protéine de liaison à la séquence TATA (TBP) et au moins huit sous-unités supplémentaires (TAF). Les facteurs de transcription TFII, de même que la TBP, sont souvent appelés des facteurs de transcription «de base» ou «généraux» parce qu'ils représentent l'exigence minimale à satisfaire pour permettre l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II à un promoteur. La figure 18-39b montre la structure de la protéine de liaison à la séquence TATA liée à l'ADN. Plusieurs protéines capables de reconnaître la séquence CCAAT ont été identifiées dans les cellules de mammifères. Ces facteurs peuvent distinguer entre elles les sous-unités des éléments CCAAT. Les séquences GC sont reconnues par d'autres facteurs. La protéine Spl, par exemple, reconnaît les séquences GC situées en amont du promoteur de SV40 (figure 18-38). Des facteurs qui se lient aux séquences TATA ont été identifiés chez *Drosophila* et chez la levure.

Les protéines GCN4 et GAL4 constituent des exemples de facteurs de levure opérant en *trans* qui agissent au niveau de séquences activatrices amont (UAS). La protéine GCN4 active la transcription de nombreux gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des acides aminés. En réponse à une carence en acides aminés, la concentration de la protéine GCN4 augmente, ce qui accroît le taux d'expression des gènes des biosynthèses d'acides aminés. Les UAS reconnues par la protéine GCN4 comportent en tant qu'élément de reconnaissance principal la séquence ATGACTCAT. Quant à la protéine GAL4, elle intervient dans l'activation des UAS des promoteurs des gènes impliqués dans le métabolisme du galactose. GAL4 se lie à quatre sites possédant des séquences similaires de 17 paires de bases présentes dans ces différents promoteurs.

La structure en domaines fonctionnels des facteurs de transcription

Plusieurs aspects intéressants des facteurs opérant en trans se sont dégagés d'études récentes. Il est clair que beaucoup de ces protéines comportent deux domaines distincts : l'un reconnaît les séquences actives en *cis* de l'ADN tandis que le second stimule effectivement la transcription. C'est le cas de la protéine GAL4 qui comporte 881 acides aminés. Un fragment de la protéine ne comportant que les 147 premiers résidus est capable de se lier à l'ADN à des sites UAS spécifiques mais est incapable d'activer la transcription. Néanmoins, des fragments contenant des séquences situées plus loin dans la protéines ne peuvent pas se fixer à l'ADN mais provoquent l'activation à condition d'être attachés à des fragments capables de s'y fixer. De plus, lorsque les 144 résidus carboxy-terminaux de GAL4 sont fusionnés avec le segment du récepteur humain de l'œstrogène capable de se lier à l'ADN, la protéine hybride obtenue est capable d'activer la transcription au site de liaison normalement reconnu par le récepteur de l'œstrogène. Cette expérience montre non seulement que plusieurs protéines différentes possèdent des domaines structuraux analogues mais aussi que les mécanismes d'activation mis en jeu dans ces différents systèmes sont apparentés. Dans une expérience similaire, un hybride fut construit entre deux récepteurs différents d'hormones stéroïdes : le récepteur glucocorticoïde et celui de la progestérone. Dans ce cas, la région de liaison à l'ADN du récepteur de l'hormone glucocorticoïde est substituée à la région de liaison du récepteur de la progestérone tandis que la région activatrice de ce dernier reste intacte. La protéine fusionnée répond maintenant en se liant aux éléments régulateurs des glucocorticoïdes et en stimulant la transcription des gènes situés en *cis* — mais uniquement en réponse à la progestérone.

Les motifs structuraux des facteurs de transcription

Les domaines de liaison à l'ADN des facteurs de transcription eucaryotiques appartiennent le plus souvent à une des familles structurales décrites ci-après.

Un premier groupe de protéines régulatrices opérant en position *trans* possède un motif de type **hélice-tournant-hélice** (figure 18-40) analogue à celui qu'on trouve dans de nombreuses protéines de régulation bactériennes (figure 18-34). Beaucoup de ces protéines sont impliquées dans le développement de la drosophile, en particulier dans la détermination de l'arrangement spatial des segments du corps (voir les pages 766 à 769). Les gènes qui codent pour ces protéines appelées *homéotiques* comportent une séquence commune dans la région qui code pour le domaine de liaison à l'ADN. Cette séquence, qu'on appelle la **boîte homéotique**, code pour l'hélice de reconnaissance de l'ADN du segment hélice-tournant-hélice de ces protéines régulatrices. Comme le montre la figure 18-40, ce domaine comporte trois hélices. L'hélice 3 est l'hélice de reconnaissance qui établit des contacts essentiels avec l'ADN. Les hélices 1 et 2 sont en contact avec d'autres protéines.

Un autre motif structural fréquent est lié à la présence dans les domaines de liaison à l'ADN de régions riches en cystéines et en histidines capables de complexer le zinc. Les saillies qui apparaissent dans la structure de ces protéines ressemblent à des doigts (figure 18-41) ; pour cette raison, ces structures ont reçu le nom de **doigts à zinc** («zinc fingers»). On a trouvé des doigts à zinc dans les récepteurs des stéroïdes et dans les facteurs de transcription agissant sur de nombreux promoteurs.

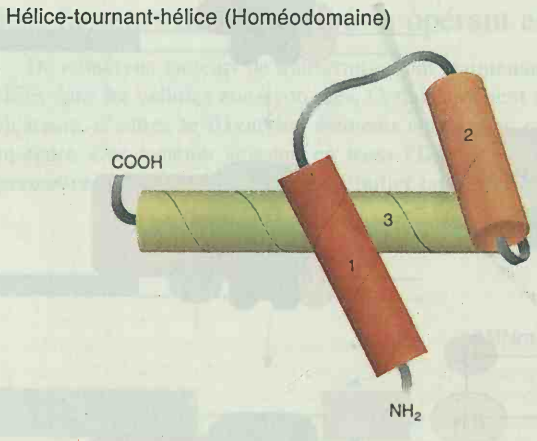


Figure 18-40. Modèle structural du domaine de liaison à l'ADN de type hélice-tournant-hélice.(De J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller. *ADN Recombinant*, 1ère édit. franç. Copyright © 1994 par De Boeck-Wesmael, S.A.)

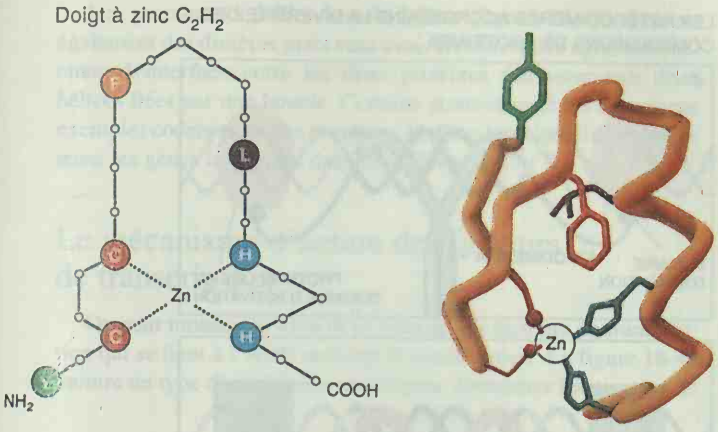


Figure 18-41. Modèle structural du domaine de liaison à l'ADN de type doigt à zinc. (D'après J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller. *ADN Recombinant*, 1ère édit. franç. Copyright © 1994 par De Boeck-Wesmael, S.A.)

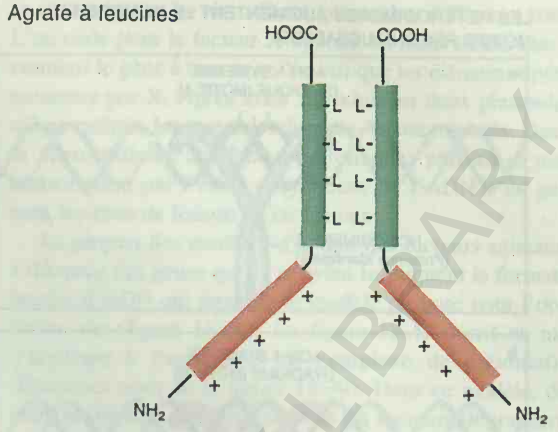


Figure 18-42. Modèle structural du domaine de liaison à l'ADN de type agrafe à leucines. (D'après J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller. *ADN Recombinant*, 1ère édit. franç. Copyright © 1994 par De Boeck-Wesmael, S.A.)

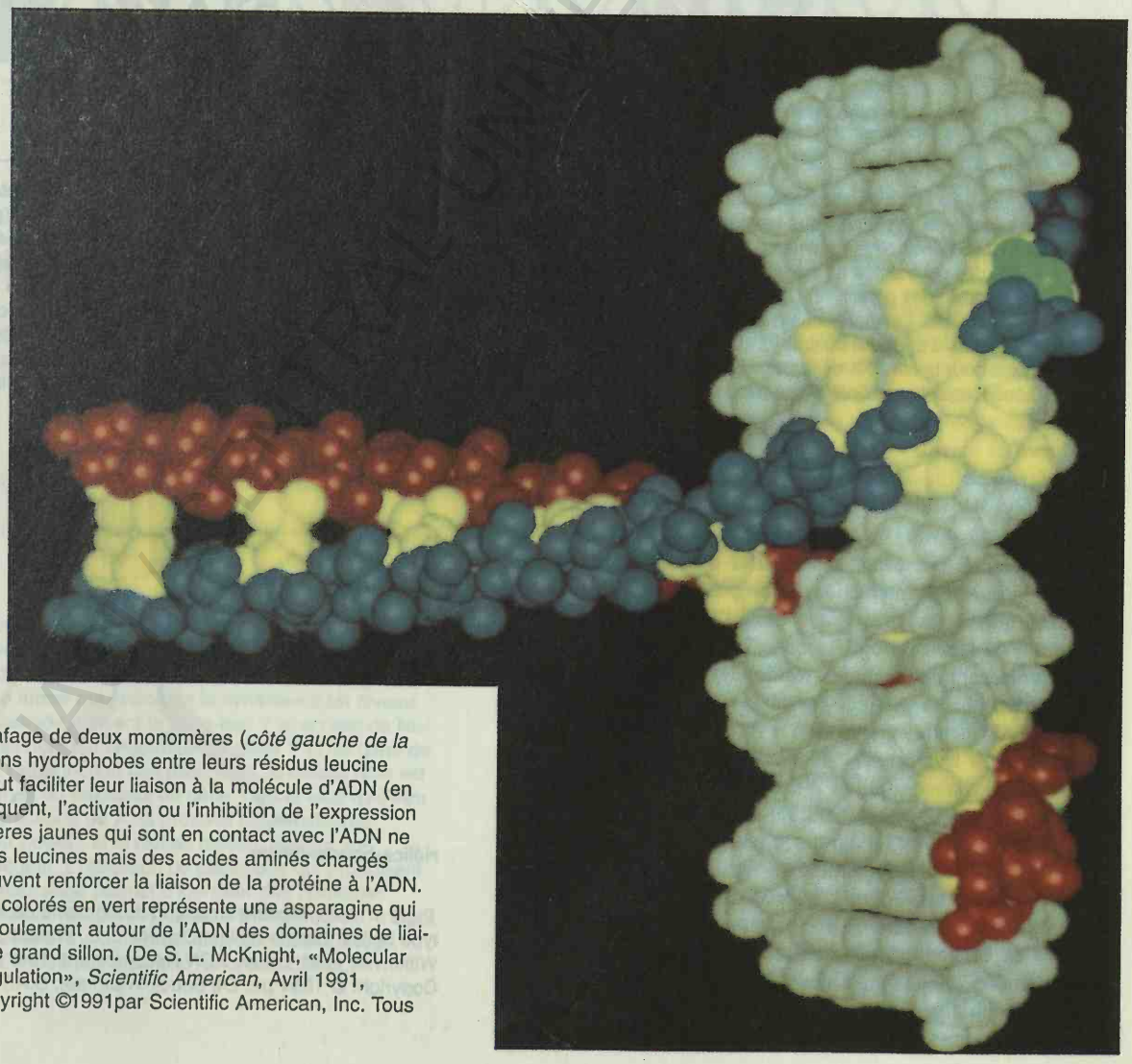


Figure 18-43. L'agrafage de deux monomères (*côté gauche de la figure)* par des liaisons hydrophobes entre leurs résidus leucine (sphères jaunes) peut faciliter leur liaison à la molécule d'ADN (en blanc) et, par conséquent, l'activation ou l'inhibition de l'expression des gènes. Les sphères jaunes qui sont en contact avec l'ADN ne représentent pas des leucines mais des acides aminés chargés positivement qui peuvent renforcer la liaison de la protéine à l'ADN. Le groupe d'atomes colorés en vert représente une asparagine qui pourrait faciliter l'enroulement autour de l'ADN des domaines de liaison localisés dans le grand sillon. (De S. L. McKnight, «Molecular Zippers in Gene Regulation», *Scientific American*, Avril 1991, 1991,pp. 53-64. Copyright ©1991par Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

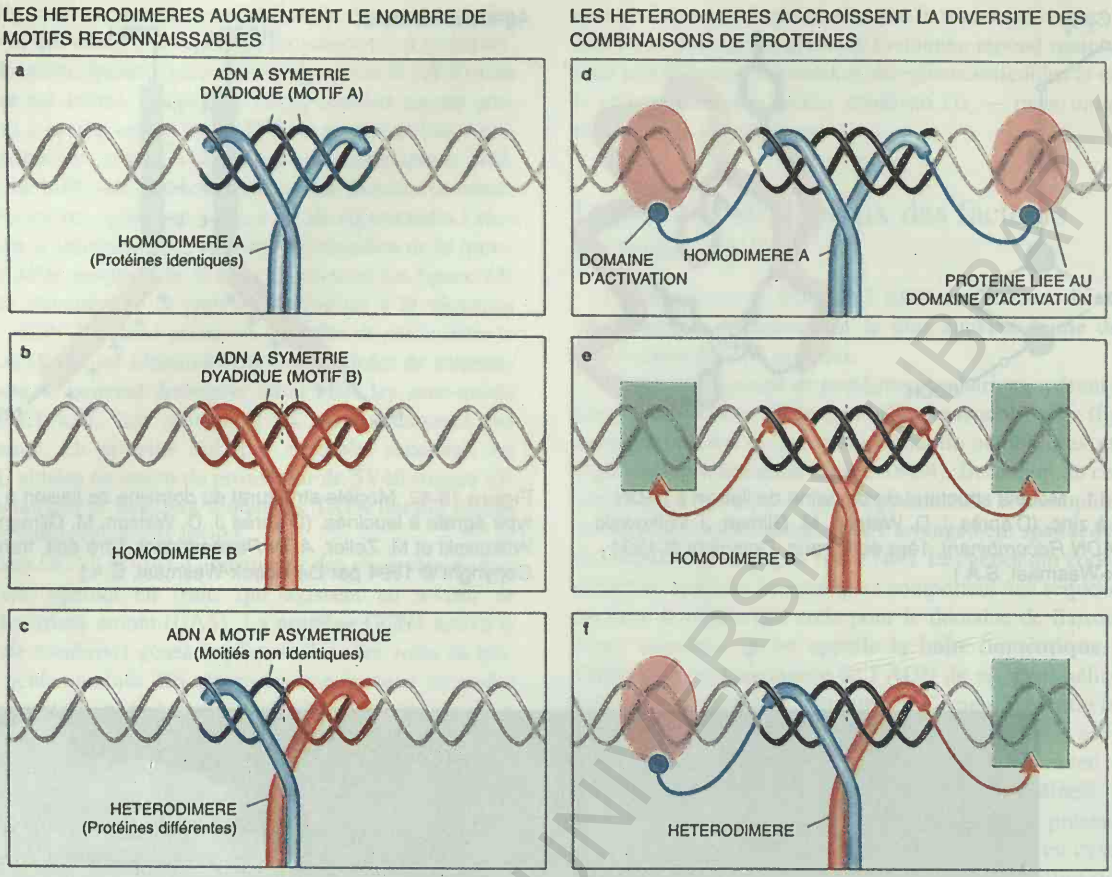
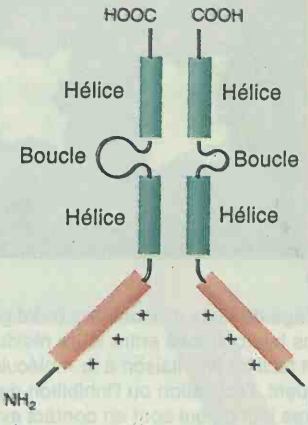


Figure 18-44. Les hétérodimères formés par l'agrafage de paires de sous-unités non identiques présentent deux avantages pour un organisme. (1) Tandis que les sous-unités d'un homodimère ne reconnaissent que des motifs à symétrie dyadique (panneaux a et b), l'existence d'hétérodimères dont les sous-unités sont capables de reconnaître des séquences différentes (panneau c), libère l'ADN des contraintes de symétrie et augmente par conséquent le nombre de motifs de séquence diponibles pour la régulation de l'expression des gènes. (2) D'autre part, le gain en diversité associé à la formation d'hétérodimères se manifeste aussi au niveau des protéines. Les domaines d'activation des sous-unités d'un homodimère interagissent toujours avec des protéines identiques (panneaux d et e). Au contraire, les hétérodimères peuvent se lier à deux protéines différentes, ce qui accroît les stratégies disponibles pour le contrôle de la mise en route ou de l'arrêt de l'expression des gènes. (D'après S. L. Mc Knight, «Molecular Zippers in Gene Regulation», *Scientific American*, Avril 1991, pp. 16-42. Copyright © 1991 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés).

Les protéines possèdant des **agrafes à leucines** forment des dimères grâce à des interactions hydrophobes entre des leucines présentes tous les sept résidus, comme l'illustre la figure 18-42. Les agrafes à leucines sont flanquées d'un domaine de liaison à l'ADN contenant de nombreux résidus lysine et arginine. La formation d'un dimère est indispensable à la liaison à l'ADN. La figure 18-43 montre la liaison à l'ADN d'une protéine munie d'une agrafe à leucines. De nombreux proto-oncogènes (voir le chapitre 24), comme *c-jun* et *c-fos*, codent pour des protéines à agrafe à leucines. Des **hétérodimères**, résultant d'une dimérisation entre des protéines à agrafes à leucines différentes, peuvent également se former et présentent un avantage pour les organismes en accroissant le nombre de séquences d'ADN et la diversité des combinaisons protéiques disponibles pour mettre en marche ou arrêter l'expression des gènes, comme l'illustre la figure 18-44. Les hétérodimères des protéines c-Jun et c-Fos, par exemple, se lient beaucoup plus fortement à l'ADN que les **homodimères** de c-Fos ou de c-Jun seules.



Hélice-boucle-hélice

Figure 18-45. Modèle structural du domaine de liaison à l'ADN de type hélice- boucle-hélice.(D'après J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller. *ADN Recombinant*, 1ère édit. franç. Copyright © 1994 par De Boeck-Wesmael, S.A.)

Les protéines à **hélice-boucle-hélice** (figure 18-45) forment également des dimères mais sans avoir recours à des agrafes à leucines. L'interface entre les deux protéines fait intervenir deux hélices liées par une boucle. Certains proto-oncogènes (*c-myc* par exemple) codent pour des protéines à hélice-boucle-hélice, comme aussi les gènes impliqués dans la différenciation

Le mécanisme d'action des facteurs de transcription

On peut montrer in vivo et in vitro qu les facteurs de transcription qui se lient à l'ADN activent la transcription. La figure 18-46 montre un type d'expérience utilisé pour démontrer l'activation de la transcription in vivo. Deux plasmides différents sont utilisés. L'un code pour le facteur X opérant en *trans* tandis que le second contient le gène à transcrire Y ainsi que les éléments opérant en *cis* reconnus par X. Après avoir introduit les deux plasmides dans la même cellule, les transcrits du gène Y sont mesurés. Des systèmes in vitro utilisent des facteurs protéiques purifiés et mesurent la transcription par l'ARN polymérase de l'ADN d'un gène contenant les sites de liaison de ce facteur.

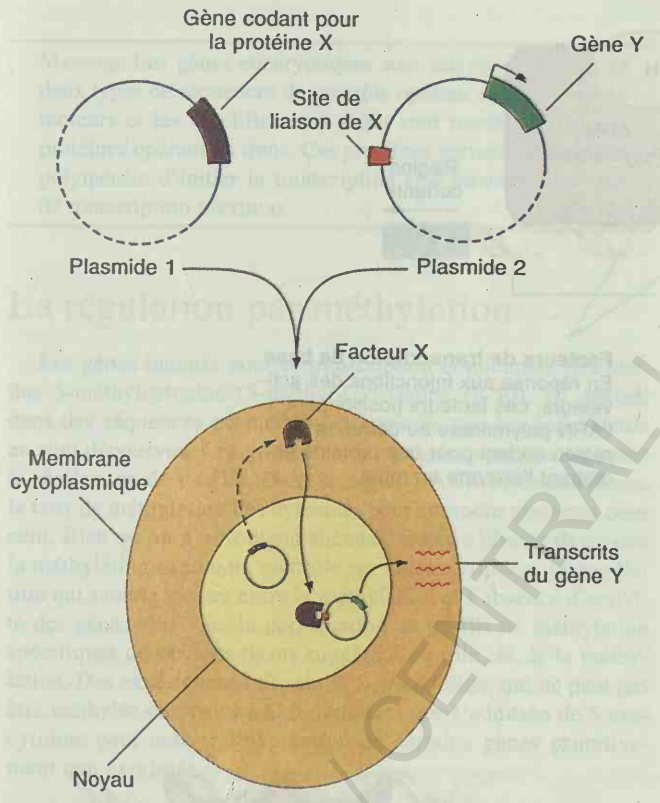


Figure 18-46. Un test in vivo de l'activité d'un facteur de transcription. Une cellule hôte reçoit deux plasmides recombinants. L'un contient le gène codant pour la protéine X, le facteur de transcription étudié, sous une forme qui permettra la synthèse à un niveau élevé. Le second plasmide contient le gène-test Y et un site de liaison pour X. La cellule hôte est dépourvue du gène Y et du gène de la protéins X. Après l'introduction des plasmides, la cellule hôte est testée pour la présence du transcrits du gène Y. Si le taux d'ARNm de Y augmente en présence de X, la protéine est considérée comme un régulateur positif ; si le niveau baisse, elle est vue comme un facteur négatif. L'utilisation de plasmides qui produisent un facteur muté ou réarrangé permet d'identifier des domaines importants de la protéine. (D'après H. Lodish, D. Baltimore,, A. Berk, L. Zipursky, P. Matsudaira and J. Darnell,*Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books.)

La plupart des modèles d'action des facteurs agissant en *trans* à distance des gènes qu'ils activent impliquent la formation d'une boucle d'ADN qui rappelle le modèle proposé pour l'opéron bactérien *ara* (figure 18-20). La figure 18-47 décrit un modèle qui s'applique à l'activation du complexe de préinitiation (PIC) (Souvenez-vous de la figure 18-39). Dans ce modèle, des activateurs multiples interagissent avec les facteurs de transcription par l'intermédiaire de «coactivateurs» qui relaient les signaux des activateurs vers les facteurs de transcription. Certains des TAF de TFIID (figure 18-39) sont des exemples de coactivateurs. Ce modèle, qui découle d'expériences de B Franklin Pugh, Robert Tijan et leurs collaborateurs, est illustré dans la figure 18-48 qui souligne l'interaction de l'activateur, dans le cas présent la protéine Sp1, avec le coactivateur.

La régulation des facteurs de transcription

Certains facteurs de transcription ne sont synthétisés que dans des tissus spécifiques et leurs activités elles-mêmes peuvent être régulées dans certains tissus, comme nous le verrons ci-dessous.

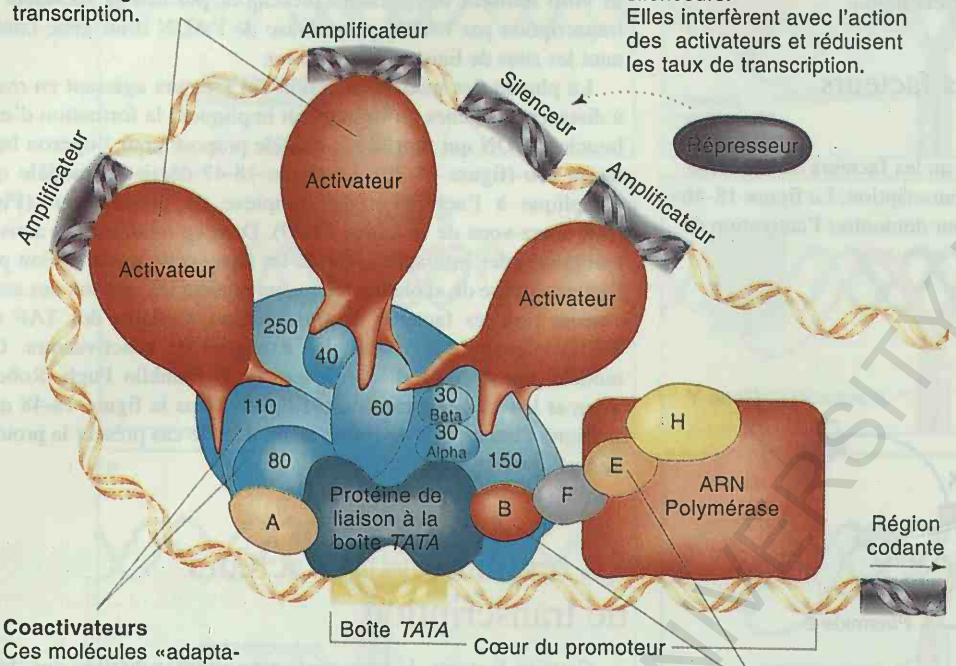
Les hormones stéroïdes

Dans de nombreux cas, les facteurs de transcription sont activés par des hormones. Ces molécules sont en général synthétisées dans des cellules spécialisées et transportées ensuite vers les cellules où elles agissent. Des hormones peptidiques comme l'insuline opèrent principalement en se liant à des récepteurs de la surface cellulaire et en provoquant la transmission à travers la membrane cytoplasmique d'un signal qui induit des modifications à l'intérieur de la cellule. Dans certains cas, les protéines elles-mêmes sont transportées dans la cellule. De petites hormones, en particulier les hormones stéroïdes, pénètrent dans les cellules grâce à leurs propriétés de solubilité dans les milieux lipidiques et se lient à des récepteurs nucléaires. A cet égard elles se comportent d'une manière analogue à celle des inducteurs de certains systèmes bactériens.

Un exemple de ce type de comportement est celui d'une hormone sexuelle femelle, l'œstrogène. La synthèse de l'ovalbumine, une protéine du blanc d'œuf, a lieu dans l'oviducte en réponse à une stimulation spécifique du gène de l'ovalbumine par cette hormone. L'œstrogène active la transcription en se liant à l'ADN d'un amplificateur en même temps qu'une protéine réceptrice qui reconnaît la molécule d'œstrogène dans le cytoplasme et la transporte ensuite dans le noyau. L'activation des gènes par le complexe stéroïde-récepteur a été bien étudiée chez le virus de la tumeur mammaire de souris (MMTV). Ce virus se réplique activement dans des cellules à contenu élevé en glucocorticostéroïdes. La figure 18-49 schématise l'action de ces stéroïdes sur la transcription du MMTV.

Activateurs
Ces protéines se lient aux gènes à des sites appelés amplificateurs Les activateurs déterminent les gènes qui doivent être mis en route et augmentent les taux de transcription.

Répresseurs
Ces protéines se lient à des ensembles de gènes choisis au niveau de sites appelés silenceurs.
Elles interfèrent avec l'action des activateurs et réduisent les taux de transcription.



Coactivateurs
Ces molécules «adaptatrices» reçoivent les signaux des activateurs et peut-être des répresseurs et les transmettent aux facteurs de base

Facteurs de transcritpion de base
En réponse aux injonctions des activateurs, ces facteurs positionnent l'ARN polymérase au début de la région codant pour une protéine et mettent l'enzyme en route.

Figure 18-47. La machinerie moléculaire qui contrôle la transcription dans les cellules humaines comporte quatre types de composants. Des facteurs de transcription de base (formes rouge et orange dans le bas de la figure), en général représentés par des lettres uniques, sont essentiels pour la transcription mais ne peuvent pas à eux seuls accroître ou diminuer le taux de celle-ci. Cette fonction appartient à des molécules de régulation qui jouent le rôle d'activateurs (en rouge) ou de répresseurs (en gris) ; ceux-ci varient de gène à gène. Les activateurs, et probablement aussi les répresseurs, communiquent avec des facteurs de base par l'intermédiaire de coactivateurs (en bleu) — des protéines qui forment un complexe très ferme avec la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP), le premier des facteurs de base à se lier à une région régulatrice connue comme le *cœur du promoteur*. Les coactivateurs sont désignés selon leurs poids moléculaires (en kilodaltons). (De Robertt Tijan, «Molecular Machines that Control Genes», *Scientific American*, Février 1995, pp. 55-61. Copyright ©1995 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

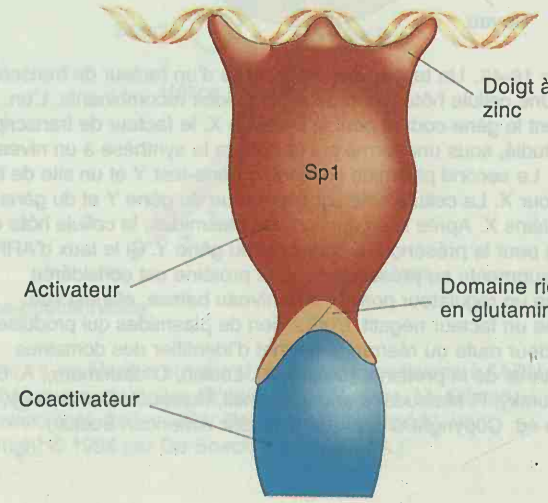


Figure 18-48. Interaction de l'activateur Sp1 avec le coactivateur. Lorsque Sp1 se lie à l'ADN, une région riche en glutamine transmet des signaux stimulateurs de la transcription à un coactivateur spécifique. (De Robert Tijan, «Molecular Machines that Control Genes», *Scientific American,* Février 1995, pp 55-61. Copyright ©1995 par Scientific American Inc. Tous droits réservés.)

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

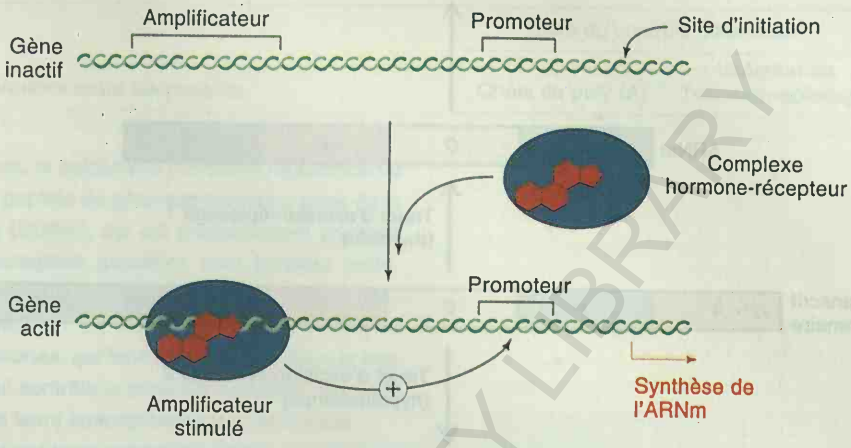


Figure 18-49. L'action des hormones stéroïdes au niveau des séquences de l'amplificateur. Une hormone glucocorticoïde (en bleu) se lie à une protéine réceptrice soluble. Ce complexe, à son tour, se lie aux amplificateurs (enhancers), comme celui de l'ADN du virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV) et leur permet de stimuler la transcription des gènes répondant aux hormones. (De L. Stryer, *Biochemistry*, 4ième éd. Copyright © 1995 par W.H. Freeman and Company.)

Message Les gènes eucaryotiques sont activés au niveau de deux types de séquences de contrôle opérant en cis – les promoteurs et les amplificateurs – qui sont reconnues par des protéines opérant en trans. Ces protéines permettent à l'ARN polymérase d'initier la transcription et d'atteindre des taux de transcription maximas.

La régulation par méthylation

Les gènes inactifs pour la transcription contiennent des résidus 5-méthylcytosine (5-méthyl-C ; figure 18-50), en général dans des séquences p5-méthyl-CpG, tandis que les gènes actifs en sont dépourvus. Ces groupements méthyles sont ajoutés après la réplication de l'ADN. Dans le cas de l'ADN de mammifères, le taux de méthylation des cytosines peut atteindre plusieurs pour cent. Bien qu'on n'ait obtenu aucune évidence directe de ce que la méthylation exerce un contrôle sur la transcription, la corrélation qui semble exister entre la méthylation et l'absence d'activité des gènes ainsi que la perpétuation de profils de méthylation spécifiques de certains tissus suggèrent un rôle clé de la méthylation. Des expériences utilisant la 5-azacytidine, qui ne peut pas être méthylée en position C-5, montrent que l'addition de 5-azacytidine peut activer l'expression de certains gènes primitivement non exprimés.

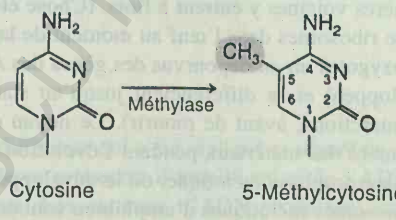


Figure 18-50. La cytosine peut être transformées en 5-méthylcytosine par les méthylases.

Les contrôles post-transcriptionnels

La maturation différentielle

Nous avons vu au chapitre 13 que certains transcrits sont l'objet d'une maturation après leur synthèse. Des queues poly(A) leur sont ajoutées et, le transcrit primaire subit une excision-épissage qui produit les ARNm fonctionnels. La figure 18-51 montre comment la maturation d'un même transcrit peut fournir des ARNm différents selon le trajet d'excision-épissage suivi. Ainsi, à partir d'un même transcrit, un trajet de maturation produit la calcitonine dans la thyroïde tandis qu'un autre mène au CGRP dans l'hypothalamus. Des différences dans l'addition des queues poly(A) peuvent également mener à la formation d'ARNm différents à partir d'un même transcrit primaire. Le tableau 18-4 fournit d'intéressants exemples de maturation différentielle de pré-ARNm.

Le contrôle de la dégradation des ARNm

Il est clair que la concentration cytoplasmique d'un ARNm ne dépend pas seulement de son taux de synthèse mais aussi de sa stabilité. En contrôlant la vitesse de rotation (turnover) des ARNm, les cellules disposent d'un moyen supplémentaire de moduler la concentration des ARNm. Les queues poly(A) assurent une stabilisation des ARNm ; sans queues poly(A), les ARNm sont dégradés plus rapidement. D'autres facteurs qui affectent la stabilité de certains ARNm sont les hormones, certaines molécules de faible poids moléculaire et la présence de séquences spécifiques aux extrémités 3' non traduites de ces ARNm. Une catégorie d'ARNm à demi-vie courte possède par exemple des séquences répétées de la forme AUUUA à ses extrémités 3', comme l'illustre la figure 18-52a. Le transfert d'une de ces séquences dans le gène de la β-globine dont le messager est plus stable réduit la demi-vie de cet ARNm de 10 heures à moins de 2 heures, comme nous le voyons à la figure 18-52b.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

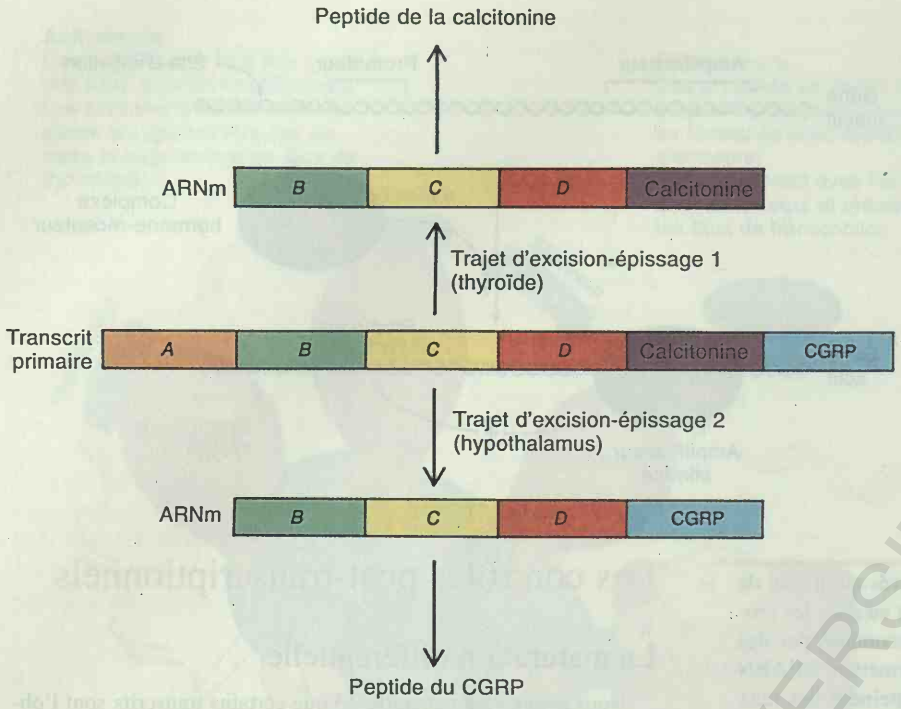


Figure 18-51. Des trajets d'excision-épissage différents dans des organes distincts fournissent des produits de traduction différents à partir du même transcrit primaire.

Le contrôle des molécules ubiquistes dans les cellules eucaryotiques

Plusieurs classes de molécules existent en abondance dans toutes les cellules eucaryotiques : les histones, la machinerie de traduction, les composants des membranes, etc. Plusieurs stratégies se sont développées pour assurer le maintien de quantités suffisantes de ces produits dans la cellule eucaryotique. Ces stratégies comprennent la transcription continue et répétée au cours du cycle cellulaire, la répétition des gènes et l'amplification extrachromosomique de certaines séquences génétiques spécifiques.

La redondance génétique

Les gènes codant pour les ARNr et les ARNt ont été analysés de manière approfondie parce que leurs produits purifiés sont disponibles et peuvent servir de sondes pour recouvrer les ADN complémentaires. De simples hybridations ADN-ARN montrent que chaque chromosome de *Xenopus* porteur d'un organisateur nucléolaire possède 450 copies de l'ADN qui code pour les ARNr 18S et 28S. Mais il y a dans chaque noyau 20.000 copies des gènes qui codent pour l'ARNr 5S et ces gènes ne sont pas localisés dans la région de l'organisateur nucléolaire (ON). Donald Brown et ses collaborateurs ont analysé de manière intensive pendant les années 1970 l'ADN de la région ON et ont établi qu'il contient des duplications en tandem d'une grande unité de transcription (40S) séparée de ses voisines par des espaceurs non transcrits. Le transcrit initial est ensuite maturé en libérant les petits ARNr que l'on trouve finalement dans les ribosomes.

Max Birnstiel et ses collaborateurs ont montré que les cinq gènes d'histones de l'oursin de mer sont étroitement liés (voir la figure 16-21). Il existe plusieurs centaines de copies de cette unité qui comporte la séquence des gènes *H4–H2B–H3–H2A–H1*. La transcription commence à H4 et finit à H1 ; chaque gène est transcrit sous la forme d'un seul messager. Comme nous l'avons vu dans des chapitres antérieurs, les duplications en tandem peuvent s'apparier de manière asymétrique entre chromosomes homologues ou au sein d'un même chromosome ; ces échanges augmentent ou réduisent le nombre de copies. Il reste à déterminer si (et comment) le nombre de répétitions en tandem est maintenu constant dans une espèce déterminée.

L'amplification des gènes

L'amplification de gènes spécifiques a été étudiée de manière approfondie dans le cas des gènes des ARNr des ovocytes d'amphibiens. Nous l'avons vu, chaque chromosome de *Xenopus* porte environ 450 copies de l'ADN codant pour les ARNr 18S et 28S. Toutefois, l'ovocyte contient jusqu'à 1.000 fois ce nombre de copies. L'ovocyte est une cellule très spécialisée, bourrée de matériaux nutritifs qui lui permettent de survivre sans ingestion d'aliments jusqu'au stade du têtard. Son cytoplasme contient en outre la machinerie de traduction exigée par l'exécution du programme de différenciation des nombreuses cellules de l'embryon en cours de développement.

Au cours de l'ovogénèse, l'ovocyte en cours de maturation augmente fortement de taille tandis que des matériaux venant des cellules nourricières voisines y entrent à flots. (Chose étonnante, il y a tellement de ribosomes dans l'œuf au moment de la fertilisation que les homozygotes *an an* dépourvus des gènes des ARNr 18S et 28S se développent et se différencient jusqu'au stade du têtard animé de contractions, avant de mourir). Le noyau de l'ovocyte fournit également des matériaux pendant l'évolution de la cellule vers la première prophase méiotique, où le développement s'arrête. Les chromosomes méiotiques d'amphibien sont énormes, avec de nombreuses boucles latérales correspondant à des régions d'intense activité génétique (figure 18-53). Le noyau d'ovocyte contient des centaines de nucléoles extrachromosomiques de tailles variées. Chaque nucléole renferme un anneau d'ADNr

Tableau 18-4. Exemples d'excisions-épissages différentiels de pré-ARNm

Produits des gènes	Différences entre les produits	Base du contrôle différentiel	
		Choix du poly (A)	Variation de l'excision-épissage
Mammifères :			
Calcitonine et CGRP (rat)	Deux protéines, la calcitonine (hormone régulatrice du Ca^{2+}) et le peptide du gène apparenté au gène de la calcitonine (CGRP), qui est probablement impliqué dans la perception gustative, sont formées préférentiellement dans la thyroïde et le cerveau, respectivement.	+	+
Kininogènes (vache)	Deux préhormones, qui fournissent toutes deux la bradykinine qui contrôle la pression sanguine, mais diffèrent dans leurs susceptibilités aux protéases.	+	
Chaînes lourdes des immunoglobulines (souris)	Elles diffèrent par leurs extrémités carboxyliques dans des molécules d'anticorps différentes.	+	
Troponine (rat)	Deux protéines différentes sont présentes dans des muscles différents du squelette de rat.		+
Chaînes légères de la myosine (rat)*	Deux protéines, longues respectivement de 140 et 180 acides aminés, apparaissent dans des muscles à «contractions rapides» différents.		+
Préprotachykinine (vache)	Deux préhormones qui libèrent la substance P, un neuropeptide qui affecte les muscles lisses, sont formées ; la plus grande de ces hormones libère également la substance K, un neuropeptide de fonction inconnue.		+
Fibronectine (rat)	Cette protéine de structure existe sous au moins six formes différentes.		+
Drosophila :			
Tropomyosine	Deux protéines musculaires différentes chez les embryons et les organismes adultes.		+
Chaînes lourdes de la myosine	Deux protéines musculaires différentes chez les embryons et les organismes adultes ; une troisième forme existe chez les pupes et les adultes.	+	
Ultrabithorax	Des produits de gènes différents qui contrôlent le développement des segments de la cage thoracique existent chez les jeunes embryons et les larves.	+	
Glycinamide ribotide transformylase	Cette enzyme est codée par un long ARNm ; un ARNm plus court qui partage plusieurs exons avec le premier code pour un second peptide.	+	

* Les chaînes légères de la myosine de rat sont obtenues à partir de deux transcrits primaires chevauchants possédant des extrémités 5' différentes. Les ARNm résultants contiennent aussi des exons différents dans la région de chevauchement, ainsi que quatre exons similaires. Une situation presque identique existe pour les gènes de la myosine de poulet.

Source : J. Darnell, H. Lodish and D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*, 2ème éd. Copyright © 1990 par Scientific American Books, inc.

d'une taille différente qui a été répliqué et séparé du chromosome. Les étapes de ce processus d'amplification de l'ADN sont tout à fait inconnues. Les anneaux d'ADN produisent activement des ARNr qui s'assemblent pour former des ribosomes qui seront eux-mêmes stockés dans les nucléoles en attendant leur libération pendant la méiose.

D'autres exemples d'amplification génétique sont connus. On a constaté que des nodules (puffs) spécifiques des chromosomes polytènes de diptères produisent un excès d'ADN plutôt que d'ARNm. En outre, Georges Rudkin a montré au début des années 1960 que les chromosomes polytènes des glandes salivaires de *Drosophila* peuvent eux-mêmes représenter des amplifications spécifiques d'un facteur de mille de l'ADN euchromatique, alors que les régions hétérochromatiques proximales ne

(a) Séquences 3' des ARNm instables

GMCSF	UAAUAUUUAUAUAUUUAUAUUUUUAAAAUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAA
IFNβ	UUUUGAAAUUUUUAUUAAAUUAUGAUUAUUUUUAUUUAUUUAAAUUUUAUUUU
IL-1	UUAUUUUUUAAUUAUUAUUUAUAUAUGUAUUUAUAAAUAUAUUUAAGAUAAU
TNF	AUUAUUUAUUAUUUAUUUAUUAUUUAUUUAUUUA
c-Fos	GUUUUUAAUUUAUUUAUUAAGAUGGAUUCUCAGAUAUUUAUAUUUUUAUUUU
c-Myc	UAAUUUUUUUUAUUUAAGUACAUUUUGCUUUUUAAAGUUGAUUUUUUUCU

(b) Activité des répétitions d'$A(U)_nA$

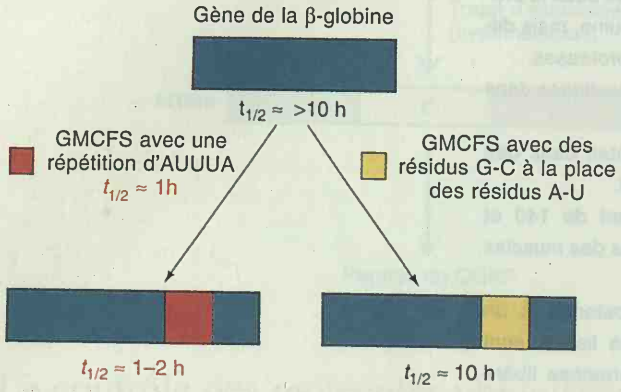


Figure 18-52. Effet d'une séquence 3' non traduite sur la stabilité d'un ARNm. (a) Séquences des régions 3' non traduites des ARNm codant pour le facteur humain stimulant du granulocyte-monocyte (GMCSF), l'interféron fibroblastique β (IFNβ), l'interleukine 1 (IL-1), le facteur nécrosant tumoral (TNF) et deux protéines proto-oncogéniques (c-Fos et c-Myc). Les séquences $A(U)_nA$ caractéristiques sont en rouge ; certaines se chevauchent. Les ARNm de nombreux autres proto-oncogènes ou facteurs de croissance cellulaires contiennent ces séquences. (b) Effet des séquences $A(U)_nA$ sur la demi-vie des ARNm. Des cellules en culture sont transfectées avec un ADN recombinant de la β-globine contenant un segment de 62 pb d'ADN de GMCSF codant soit pour le segment $A(Un)A$ montré en a, soit pour un segment modifié où de nombreux résidus A-U sont remplacés par des résidus G-C. L'effet déstabilisant des séquences $A(U)_nA$ est montré clairement par la diminution de la demi-vie ($t_{1/2}$) des ARNm correspondants. (Voir G. Shaw et R. Kamen, *Cell* 46, 1986, 659. D'après J. Darnell, H. Lodish et D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*, 2ième éd. Copyright © 1990 par Scientific American Books.)

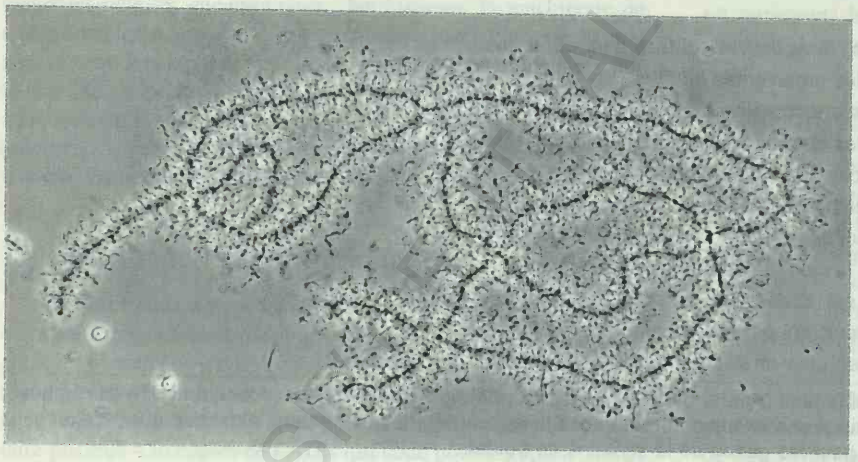


Figure 18-53. Les chromosomes en écouvillon d'un ovocyte d'amphibien. (Photographie due à l'obligeance de J. Gall).

sont répliquées que quelques fois. Il existe donc, en plus du mécanisme normal de la réplication de l'ADN chromosomique pour la division cellulaire, un moyen d'amplifier des loci spécifiques à l'exclusion des autres.

Message Il existe des mécanismes cellulaires qui garantissent un approvisionnement adéquat des produits des gènes essentiels pour la survie de toutes les cellules. Ces mécanismes consistent notamment en un accroissement du nombre de copies par chromosome de certains gènes (redondance) ou en une augmentation du nombre de copies de gènes dans la cellule (amplification).

BCU LAUSANNE

RÉSUMÉ

Le modèle de l'opéron explique comment les gènes procaryotiques sont régulés, grâce à un mécanisme qui coordonne l'activité d'un certain nombre de gènes apparentés. Dans le contrôle négatif, l'initiation de la transcription est régulée au niveau de l'opérateur par un répresseur dont l'affinité de liaison à cet opérateur peut être modifiée par l'inducteur. L'inactivation du répresseur — l'élément de contrôle négatif — est requise pour réaliser une transcription active. Dans le cas du contrôle positif, l'initiation de la transcription exige un facteur d'activation. Parfois, un mode de contrôle se superpose à un autre. Dans le cas de l'opéron *lac*, par exemple, le système de contrôle positif par le complexe AMPc-CAP s'ajoute au système répresseur-opérateur. La modulation de la transcription par un mécanisme d'atténuation complète le contrôle de type répresseur-opérateur de l'opéron *trp*. Chez le phage λ, des sites de liaison multiples pour les répresseurs, ainsi que des répresseurs de répresseurs, introduisent des niveaux de contrôle supplémentaires.

Un problème majeur en ce qui concerne le contrôle de la transcription chez les eucaryotes est de comprendre comment des milliers de promoteurs sont régulés pour produire des taux adéquats d'ARNm. Il est clair à présent que les promoteurs sont contrôlés à la fois par le nombre et le type d'éléments agissant en position *cis* qu'ils comportent et par l'action de protéines régulatrices capables de reconnaître ces éléments. D'autres séquences agissant en position *cis* sont également impliquées dans la modulation de la transcription ; ce sont les amplificateurs (ou enhancers) qui, lorsqu'ils sont reconnus par des protéines régulatrices fonctionnelles, peuvent considérablement accroître l'activité des promoteurs. A certains égards, le contrôle de la transcription chez les eucaryotes est analogue à celui des procaryotes : dans les deux cas, des facteurs opérant en *trans* reconnaissent des sites agissant en position *cis* (ou *cis*-dominants). Le mécanisme d'action peut même être analogue ainsi qu'en témoigne la formation de boucles d'ADN dans le système *ara* des bactéries aussi bien que sous l'action des amplificateurs eucaryotiques. En outre, les motifs structuraux des protéines régulatrices possèdent un point commun en ce qui concerne le motif hélice-tournant-hélice que l'on trouve dans les protéines régulatrices bactériennes et dans les protéines homéotiques de *Drosophila*. Par contre, certains motifs structuraux comme, par exemple, les doigts à zinc ou les agrafes à leucines présents dans de nombreux facteurs agissant en *trans*, semblent n'exister que dans des protéines régulatrices eucaryotiques. Les taux des ARNm eucaryotiques sont contrôlés de diverses manières, y compris au niveau de la synthèse et de la dégradation.

Diagramme conceptuel

Dressez un diagramme conceptuel liant autant des termes suivants que possible.Notez qu'ils ne sont présentés dans aucun ordre particulier.

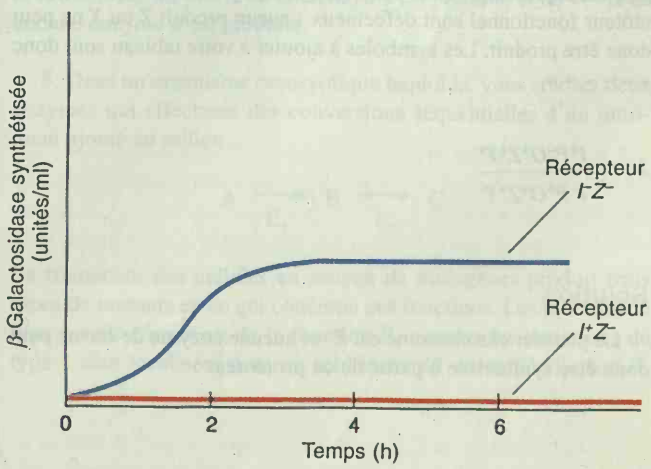
environnement / promoteur / opérateur / gène / opéron / ARN polymérase / ARNm / amplificateur / facteurs agissant en *trans* / régulation

PROBLÈME DE SYNTHESE

Au chapitre 10, nous avons vu comment les souches Hfr transfèrent un segment de leur chromosome dans une souche réceptrice et dans ce chapitre-ci nous venons de voir comment Jacob, Pardee et Monod ont exploité ce phénomène pour construire des diploïdes partiels et temporaires. Expliquez ce qui se passe pour l'expression de *lacZ* lorsqu'un Hfr transfert les gènes I^+Z^+ dans un récepteur I^-Z^- dans des conditions qui interdisent la synthèse des protéines dans la souche donneuse. Comment cela se passerait-il si nous utilisions le même récepteur, mais I^+Z^-, et y transférions les mêmes gènes I^+Z^+ de l'Hfr ? Faites un graphique montrant les résultats de ces deux expériences.

Solution

Ainsi que le montre la figure 18-6, l'introduction des gènes I^+Z^+ dans le cytoplasme de cellules ne contenant pas de répresseur provoque une synthèse passagère de β-galactosidase qui se poursuit jusqu'au moment où assez de répresseur s'est accumulé dans le cytoplasme pour bloquer toute synthèse supplémentaire (voyez le diagramme qui suit). Dans le cas d'un d'un récepteur I^+Z^-, il y a déjà du répresseur dans le cytoplasme et il n'y a donc pas de synthèse initiale de β–galactosidase :



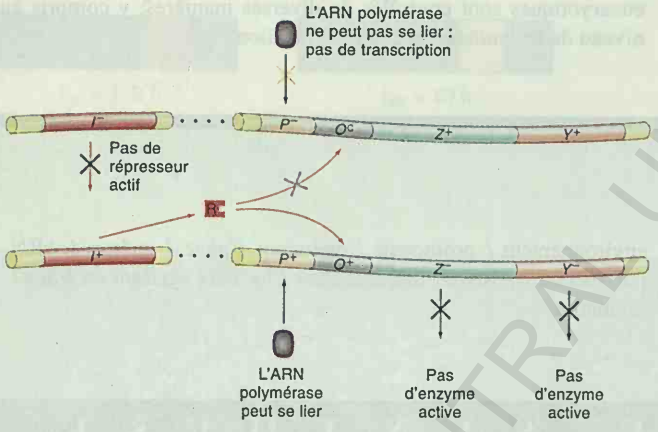
PROBLÈMES RÉSOLUS

Cet ensemble de quatre problèmes résolus, qui sont similaires au problème 4 proposé à la fin de ce chapitre, est destiné à vérifier notre compréhension du modèle de l'opéron. On nous propose un certain nombre de cellules diploïdes et on nous demande de déterminer si les produits des gènes *Z* et *Y* sont formés en présence ou en absence d'inducteur. Utilisez un tableau analogue à celui du problème 4 pour présenter votre réponse.

1. $\frac{I^-P^-O^cZ^+Y^+}{I^+P^+O^+Z^-Y^-}$

Solution

Une manière d'aborder ces problèmes est de considérer tout d'abord chaque chromosome séparément et de construire ensuite un diagramme. La figure suivante schématise ce diploïde :

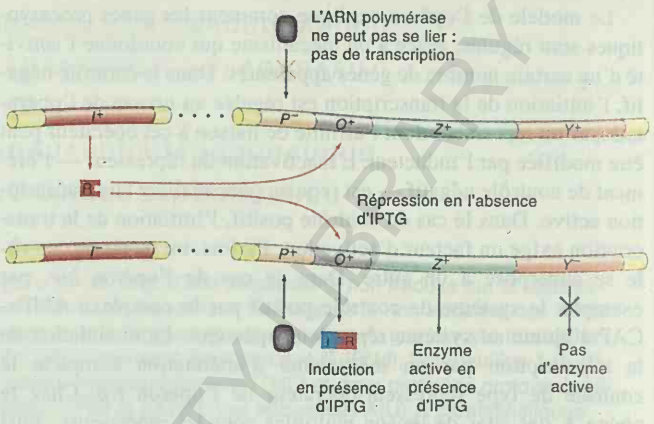


Le premier chromosome est P^- et aucune enzyme du système *lac* ne peut donc être synthétisée sous son contrôle. Le système *lac* du second chromosome (O^+) peut être transcrit et cette transcription est répressible. Toutefois, les gènes de structures liés au promoteur fonctionnel sont défectueux ; aucun produit *Z* ou *Y* ne peut donc être produit. Les symboles à ajouter à votre tableau sont donc « – – – – ».

2. $\frac{I^+P^-O^+Z^+Y^+}{I^-P^+O^+Z^+Y^-}$

Solution

Le premier chromosome est P^- et aucune enzyme de *lac* ne peut donc être synthétisée à partir de ce promoteur :

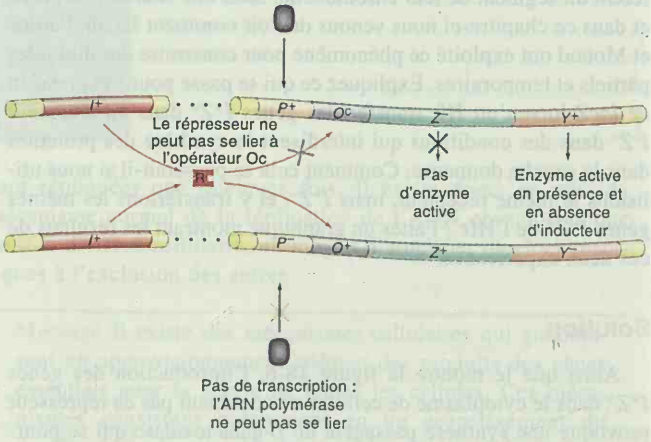


Le second chromosome est O^+ et la transcription de *lac* sur ce chromosome sera donc réprimée par le répresseur fourni par le premier chromosome, qui peut agir en *trans* par l'intermédiaire du cytoplasme. Toutefois, seul le gène *Z* de ce chromosome est intact. Donc, en l'absence d'inducteur, aucune enzyme ne sera formée ; en présence d'inducteur, seul le produit du gène *Z*, la β-galactosidase, sera formé. Les symboles à ajouter au tableau sont « – + – – ».

3. $\frac{I^+P^+O^cZ^-Y^+}{I^+P^-O^+Z^+Y^-}$

Solution

Puisque le second chromosome est P^- nous ne devons considérer que le premier :



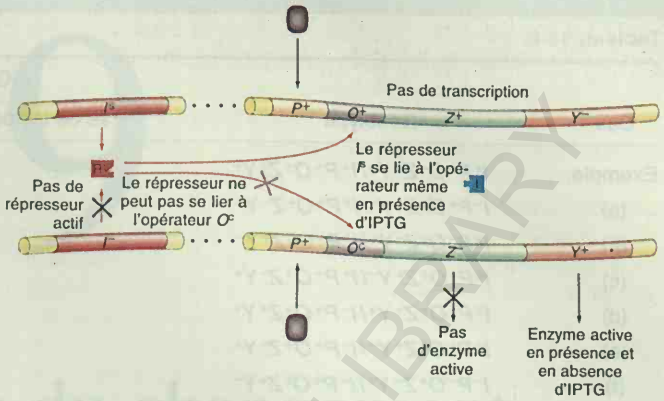
BCU IACU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ce chromosome est O^c, de telle sorte que de l'enzyme est formée en l'absence d'inducteur, mais seul le gène *Y* est actif. Les symboles pour le tableau sont « – – + + ».

4. $\dfrac{I^s P^+ O^+ Z^+ Y^-}{I^- P^+ O^c Z^- Y^+}$

Solution

En présence d'un répresseur I^s, tous les opérateurs de type sauvage seront bloqués, avec ou sans inducteur :



Le premier chromosome sera par conséquent incapable de produire de l'enzyme. Toutefois, le second chromosome possède un opérateur altéré (O^c) et peut produire de l'enzyme en absence et en présence d'inducteur. Seul le gène *Y* est actif sur ce chromosome, donc les symboles dans le tableau devraient être « – – + + ».

P R O B L È M E S

1. Expliquez pourquoi les mutations I^- du système *lac* sont normalement récessives vis-à-vis de l'allèle sauvage I^+ et pourquoi cet allèle sauvage est récessif vis-à-vis des mutations I^s.

2. Qu'entendons-nous par : les mutations O^c du système *lac* sont *cis*-dominantes ?

3. Les gènes montrés au tableau 18-5 appartiennent à l'opéron *lac* d'*E. coli*. Les symboles *a*, *b* et *c* représentent le gène du répresseur (*I*), la région opérateur (*O*) et le gène de structure (*Z*) de la β-galactosidase, mais pas nécessairement dans cet ordre. De plus, l'ordre dans lequel les symboles sont écrits dans les génotypes n'est pas nécessairement l'ordre réel dans l'opéron *lac*.

Tableau 18-5.

Génotype	Activité (+) ou absence d'activité (–) du gène *z*	
	Inducteur absent	Inducteur présent
$a^- b^+ c^+$	+	+
$a^+ b^+ c^-$	+	+
$a^+ b^- c^-$	–	–
$a^+ b^- c^+ / a^- b^+ c^-$	+	+
$a^+ b^+ c^+ / a^- b^- c^-$	–	+
$a^+ b^+ c^- / a^- b^- c^+$	–	+
$a^- b^+ c^+ / a^+ b^- c^-$	+	+

a. Indiquez quel symbole (*a*, *b* ou *c*) représente chacun des gènes *lacI*, *O* et *Z*.

b. Dans le tableau 18-5, un exposant moins après le symbole d'un gène indique un mutant mais vous savez que certains mutants ont un comportement tel qu'on leur a donné une désignation spéciale. Utilisez les symboles traditionnels de l'opéron *lac* pour désigner chaque génotype dans le tableau.

(Le problème 3 est extrait de J. Kuspira et G.W. Walker, *Genetics : Questions* and *Problems*. Copyright ©1973 par Mc Graw-Hill).

4. La carte de l'opéron *lac* est

I P O Z Y

La région promoteur (*P*) est le site où se lie l'ARN polymérase avant que ne commence effectivement la production de l'ARNm. Les promoteurs altérés par mutation (P^-) ne peuvent apparemment pas lier la molécule d'ARN polymérase. Des prévisions peuvent être faites quant à l'effet des mutations P^-. Utilisez ces prévisions et votre connaissance du système *lac* pour compléter le tableau 18-6. Introduisez un «+» là où une enzyme est produite et un «–»là où aucune enzyme n'est produite.

5. Dans un organisme eucaryotique haploïde, vous étudiez deux enzymes qui effectuent des conversions séquentielles d'un nutriment ajouté au milieu :

$$A \xrightarrow[E_1]{} B \xrightarrow[E_2]{} C$$

Le traitement des cellules au moyen de mutagènes produit trois types de mutants en ce qui concerne ces fonctions. Les mutants du type 1 sont dépourvus de la fonction E_1 ; toutes les mutations de type 1 sont localisées dans un seul locus du groupe de liaison II.

PCUASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tableau 18-6.

Cas	Génotype	β-Galactosidase		Perméase	
		Pas de lactose	Lactose	Pas de lactose	Lactose
Exemple	$I^+P^+O^+Z^+Y^+/I^+P^+O^+Z^+Y^+$	–	+	–	+
(a)	$I^-P^+O^cZ^+Y^-/I^+P^+O^+Z^-Y^+$				
(b)	$I^+P^-O^cZ^-Y^+/I^-P^+O^cZ^+Y^-$				
(c)	$I^sP^+O^+Z^+Y^-/I^+P^+O^+Z^-Y^+$				
(d)	$I^sP^+O^+Z^+Y^+/I^-P^+O^+Z^+Y^+$				
(e)	$I^-P^+O^cZ^+Y^-/I^-P^+O^+Z^-Y^+$				
(f)	$I^-P^-O^+Z^+Y^+/I^-P^+O^cZ^+Y^-$				
(g)	$I^+P^+O^+Z^-Y^+/I^-P^+O^+Z^+Y^-$				

Les mutants de type 2 ne présentent pas de fonction E_2 ; toutes les mutations de type 2 sont situées dans un locus unique du groupe de liaison VIII. Les mutants de types 3 n'ont aucune des deux fonctions E_1 et E_2 ; toutes les mutations de type 3 sont localisées dans un seul locus du groupe de liaison I.

a. Comparez ce système avec l'opéron *lac* d'*E. coli*, en signalant les similarités et les différences (veillez à expliquer chaque mutant au niveau moléculaire).

b. Si vous deviez intensifier la recherche de mutants, vous attendriez-vous à trouver de nouveaux types de mutants sur la base de votre modèle ? Expliquez.

6. Chez *Neurospora*, toutes les mutations qui affectent la carbamylphosphate synthétase et l'aspartate transcarbamylase sont localisées au locus *pyr-3*. Après avoir induit des mutations *pyr3* avec l'ICR-170 (un mutagène chimique), vous constatez que soit les deux activités enzymatiques sont absentes, soit la transcarbamylase seule est absente ; en aucun cas l'activité de synthétase n'est absente et la transcarbamylase présente. (L'ICR-170 est supposé induire des mutations de déphasage, par glissement du cadre de lecture). Interprétez ces résultats en termes d'un éventuel opéron.

7. En 1972, Suzanne Bourgeois et Alan Jobe montrèrent qu'un dérivé du lactose, l'allolactose, plutôt que le lactose lui-même, est le véritable inducteur de l'opéron *lac*. Le lactose est converti en allolactose par la β-galactosidase. Pourquoi ce résultat explique-t-il l'observation antérieure que beaucoup de mutations Z^- qui ne sont pas polaires, ne permettent néanmoins pas l'induction des lactose perméase et transacétylase par le lactose ?

8. Certaines mutations *lacI* éliminent la liaison du répresseur de *lac* à l'opérateur mais n'altèrent pas l'agrégation des sous-unités pour former un tétramère, la forme active du répresseur. Ces mutations sont partiellement dominantes par rapport à l'allèle sauvage. Pouvez-vous expliquer le phénotype partiellement I^- des hétérodiploïdes I^-/I^+ ?

9. Expliquez les différences fondamentales qui existent entre les contrôles positifs et négatifs.

10. Les mutants *lacY*$^-$ conservent la capacité de synthétiser la β–galactosidase. Néanmoins, bien que le gène *lacI* soit intact, la β–galactosidase ne peut plus être induite par l'addition de lactose au milieu de culture. Comment expliquer ceci ?

11. Quelles analogies pouvez-vous établir entre les facteurs actifs en *trans* qui activent l'expression des gènes chez les eucaryotes et les procaryotes ? Donnez un exemple.

12. Comparez l'arrangement des sites actifs en *cis* dans les régions de contrôle eucaryotiques et procaryotiques.

13. Expliquez en quoi des modèles d'opérons bactériens comme celui des gènes *ara*
s'apparentent aux protéines eucaryotiques opérant en *trans* et à leurs mécanismes d'action.

14. On sait que le répresseur Lac d'*E. coli* possède dans sa région carboxy-terminale une agrafe à leucines qui est nécessaire pour l'association des dimères en tétramères. On sait également qu'il existe au début du gène *Z* un promoteur faible, O_2,auquel le répresseur peut se lier en plus de sa liaison normale à O_1. Ces éléments sont schématisés ici :

A l'aide des figures 18-20 et 18-32 comme références, proposez un modèle qui explique pourquoi les mutations de *lacI* qui éliminent l'agrafe à leucines réduisent la capacité du répresseur à bloquer complètement la transcription de l'opéron *lac*. Faites un dessin.

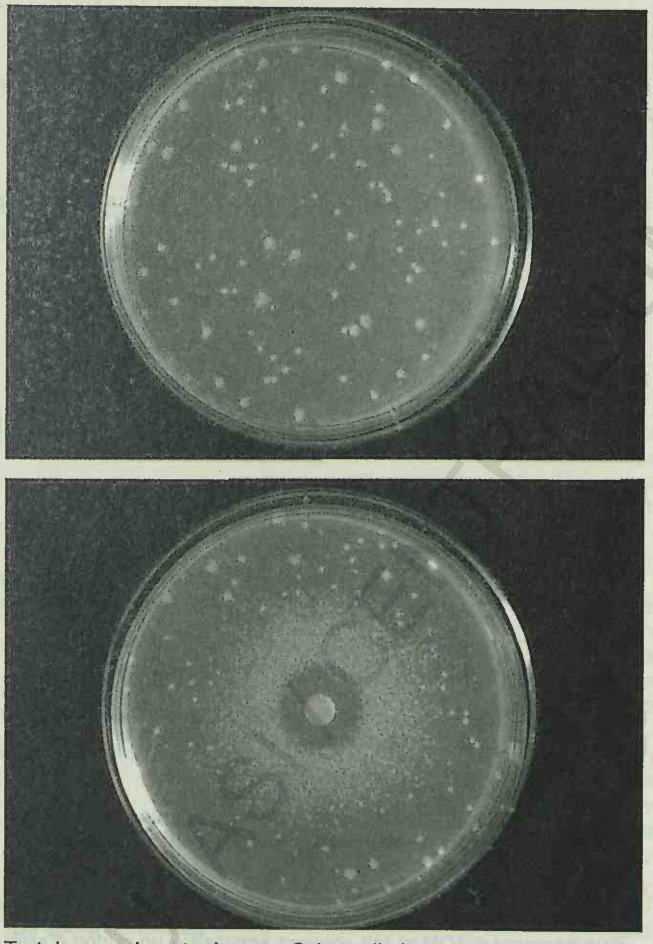
15. Une mutation intéressante dans le gène *lacI* conduit à la synthèse d'un répresseur qui présente une liaison accrue d'un facteur 100 à l'ADN, qu'il appartienne à l'opérateur ou pas. Ce répresseur montre une courbe d'iduction «inversée», en permettant la synthèse de la β-galactosidase en l'*absence* d'inducteur (IPTG) mais en la réprimant partiellement en *présence* d'IPTG. Comment expliquez-vous ceci ? Notez que l'IPTG, lorsqu'il se lie au répresseur, ne supprime pas totalement son affinité pour l'opérateur mais la réduit d'un facteur de 1.000. Dès lors lorsque les cellules se divisent et produisent de nouveaux opérateurs par la synthèse de nouveaux brins d'ADN, le répresseur doit trouver de nouveaux opérateurs le long de l'ADN, s'y lier et se dissocier des séquences qui n'appartiennent pas à l'opérateur.

BOSTON UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

19

Les mécanismes du changement génétique I : mutations géniques



Test du pouvoir mutagène sur *Salmonella* (test de Ames). (*En haut*) Une boîte de Petri sur laquelle environ 10^9 bactéries incapables de synthétiser l'histidine ont été étalées. Les colonies peu nombreuses observées sur cette boîte sont des révertants spontanés. (*En bas*) Un disque imprégné d'un agent mutagène a été déposé sur la boîte. L'agent induit un grand nombre de révertants capables de synthétiser l'histidine. Ces révertants forment un anneau de colonies autour du disque. (Photo Kristien Mortelmans, SRI International, Menlo Park, Californie)

CONCEPTS-CLÉS

- Les mutations peuvent se produire spontanément, par différents mécanismes, entre autres par des erreurs au cours de la réplication de l'ADN et par l'apparition de lésions dans l'ADN.
- Les mutagènes sont des agents qui augmentent la fréquence de formation des mutations, le plus souvent parce qu'ils altèrent l'ADN.
- Les substances potentiellement mutagènes et carcinogènes peuvent être aisément identifiées par des tests de mutagénèse, sur des systèmes bactériens.
- Les systèmes biologiques de réparation éliminent de l'ADN un grand nombre d'altérations potentiellement mutagènes.
- Les cellules qui ne possèdent pas certains des mécanismes de réparation ont un taux de mutation anormalement élevé.

UNIVERSITY LIBRARY

Plusieurs processus sont à l'origine des changements génétiques. Considérons un individu variant dans une population contrôle bien établie. Quels sont les mécanismes qui peuvent être à l'origine de la formation d'un individu variant ? Il y en a quatre :

1. Les mutations géniques
2. La recombinaison
3. Les éléments transposables
4. Les remaniements chromosomiques

Dans les chapitres précédents, nous avons considéré les changements génétiques comme des phénomènes intéressants mais nous n'avons pas analysé les mécanismes responsables de leur apparition. Nous allons maintenant voir comment se produisent, au niveau moléculaire, les différents types de changements génétiques. Ce chapitre explore les mécanismes de formation des mutations géniques. Au chapitre 20 nous nous intéresserons à la recombinaison et au chapitre 21, nous introduirons le concept d'éléments génétiques transposables. Ceux-ci peuvent provoquer des changements génétiques en se déplaçant au sein du chromosome. Bon nombre des remaniements chromosomiques tels que les grandes délétions, les duplications et les inversions résultent de l'action d'éléments transposables ou de la recombinaison.

Tableau 19-1. Résumé des changements moléculaires causés par les mutations géniques.

Type de mutation	Résultat et exemple(s)
Mutations	
Substitution d'une paire de nucléotides	
Au niveau de l'ADN	
Transition	Remplacement d'une purine par une autre purine, ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine : AT ⟶ GC GC ⟶ AT CG ⟶ TA TA ⟶ CG
Transversion	Remplacement d'une purine par une pyrimidine, ou d'une pyrimidine par une purine : AT ⟶ CG AT ⟶ TA GC ⟶ TA GC ⟶ CG TA ⟶ GC TA ⟶ AT CG ⟶ AT CG ⟶ GC
Au niveau de la protéine	
Mutation silencieuse	Le triplet muté code pour le même acide aminé : AGG ⟶ CGG tous deux codent pour Arg
Mutation neutre	Le triplet muté code pour un acide aminé différent, mais fonctionnellement équivalent : AAA ⟶ AGA Lys ⟶ Arg deux acides aminés basiques (en de nombreuses positions, une telle substitution n'altère pas la fonction de la protéine)
Mutation faux-sens	Le triplet muté code pour un acide aminé différent et non fonctionnel.
Mutation non-sens	Le triplet muté code pour un arrêt de la traduction : CAG ⟶ UAG changement d'un triplet codant pour la glutamine par un triplet ambre d'arrêt de traduction
Addition ou délétion d'une paire : mutations de décalage du cadre de lecture Addition ou délétion intragénique de plusieurs paires de bases	Toute addition ou délétion d'un nombre de paires de bases non multiple de trois provoque un décalage du cadre de lecture d'un segment d'ADN et fait souvent apparaître un codon d'arrêt de chaîne polypeptidique
Réversions	
Réversion exacte	AAA (Lys) sauvage ⟶ (mutation) GAA (Glu) mutant ⟶ (réversion) AAA (Lys) sauvage

BOUASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La base moléculaire des mutations géniques

Les mutations géniques peuvent apparaître spontanément ou être induites. Les **mutations spontanées** se produisent naturellement dans toutes les cellules. Les **mutations induites** se produisent lorsqu'un organisme est exposé à un agent mutagène (ou mutagène tout court). Les secondes apparaissent typiquement à une fréquence beaucoup plus élevée que les premières.

La compréhension des mécanismes de formation des mutations géniques nécessite une analyse au niveau moléculaire de l'ADN et des protéines. Dans les chapitres précédents nous avons vu des modèles structuraux de l'ADN et des protéines, et nous avons discuté de la nature des mutations qui peuvent altérer ces structures. Le tableau 19-1 résume l'information nécessaire pour pouvoir expliquer la nature des mutations géniques au niveau moléculaire.

Les techniques de la génétique moléculaire nous permettent maintenant de déterminer sans difficulté la séquence des nucléotides sur de longs segments d'ADN et donc, aussi, les changements de séquence résultant de la présence d'une mutation. Notre compréhension des voies qui mènent à la mutagénèse en a été grandement facilitée et l'on a même maintenant décrypté le mystère des points chauds de mutation, ces sites génétiques qui mutent avec une fréquence très élevée. Une grande partie de la recherche sur les bases moléculaires de la mutagénèse a été réalisée sur les

Tableau 19-1. *(Suite)*

Type de mutation	Résultat et exemple(s)
Réversion équivalente	UCC (Ser) sauvage —mutation→ UGC (Cys) mutant —réversion→ AGC (Ser) sauvage CGC (Arg, basique) sauvage —mutation→ CCC (Pro, non basique) mutant —réversion→ CAC (His, basique) pseudo-sauvage
Mutations suppresseur intragéniques	
Second changement de phase, de signe inverse, dans le même gène	CAT CAT CAT CAT CAT CAT (+) (−) CAT XCA TAT CAT CAT CAT ✓ ✗ ✗ ✓ ✓ ✓
Mutation faux-sens à un second site	Pas complètement compris au niveau de la fonction de la protéine ; s'explique par une distorsion secondaire qui compenserait une distorsion dans la conformation de la protéine provoquée par la première mutation.
Mutations suppresseur extragéniques	
Suppresseurs de non-sens	Un gène qui code, par exemple, pour l'ARNt-Tyr, subit une mutation dans son anti-codon qui le rend capable de reconnaître et de s'aligner sur un codon non-sens (par exemple, le triplet ambre UAG) et d'insérer à ce niveau un acide aminé (ici, la tyrosine), ce qui assure la continuation de la traduction.
Suppresseurs de faux-sens	Un groupe hétérogène de mutations dont le mécanisme moléculaire d'action n'est pas bien compris. Un suppresseur de mutations faux-sens de *E. coli* est une mutation dans un ARNt qui n'est pas létale, probablement parce que l'efficacité de la substitution anormale est faible.
Suppresseurs de décalage du cadre de lecture	Peu d'exemples connus. Dans un cas, un ARNt muté portant un anti-codon de quatre nucléotides peut lire un codon de 4 bases résultant de l'insertion d'une paire de bases.
Suppresseurs physiologiques	Un défaut dans une voie métabolique est supprimé par une autre mutation (par exemple, qui ouvre une autre voie qui mène à la synthèse du même produit, ou améliore l'efficacité du transport d'un composé produit en petites quantités à la suite de la première mutation). (groupe très hétérogène).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

bactéries et leurs virus. Toutefois, nombre de mutations responsables de maladies génétiques chez l'Homme ont été identifiées récemment. Nous passerons en revue certaines des découvertes résultant de ces études. Nous considérerons aussi les mécanismes de réparation parce qu'ils jouent un rôle crucial dans la mutagénèse en abaissant les taux de mutation jusqu'aux valeurs observées (chez *Escherichia coli*, par exemple, cette fréquence se situe entre 10^{-10} et 10^{-9} par paire de bases par cellule et par génération).

Les mutations spontanées

Des erreurs dans la réplication de l'ADN, des lésions spontanées et même des éléments transposables peuvent être à l'origine des mutations spontanées. Les deux premiers cas sont envisagés ci-dessous, le troisième le sera au chapitre 21.

Erreurs dans la réplication de l'ADN

Une erreur de réplication fait apparaître une paire de nucléotides illégitime (par exemple, A - C). Ceci mène à la formation d'une substitution.

Chacune des bases de l'ADN peut se trouver sous deux formes, appelées **tautomères,** qui sont en équilibre. C'est la forme **cétone** qui se trouve normalement dans l'ADN, alors que les formes **imino** et **énol,** plus rares, ne s'y trouvent pas (figure 19-1). Watson et Crick furent les premiers, lorsqu'ils formulèrent leur modèle de la double hélice (chapitre 11), à noter le fait que l'insertion d'un mauvais tautomère d'une base standard peut mener à un mauvais appariement et que celui-ci peut, au cours de la réplication, provoquer l'apparition d'une mutation. La figure 19-2 montre certains des mauvais appariements qui peuvent résulter du remplacement

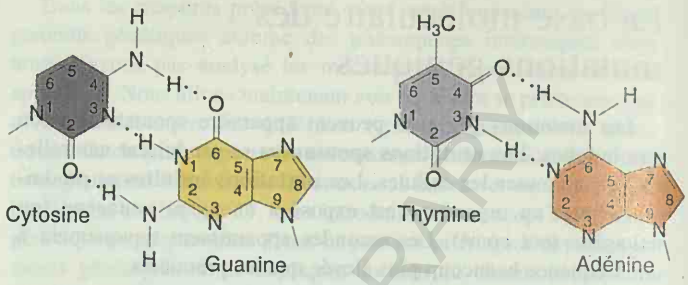


Figure 19-1. Les paires de bases dans l'ADN. Ce sont des paires normales (dites de Watson et Crick) qui sont représentées.

d'un tautomère par un autre, ce que l'on appelle une commutation tautomérique.

Des appariements incorrects se produisent aussi lorsqu'une base est **ionisée**, avec une fréquence probablement plus élevée que ceux résultant d'une commutation tautomérique.

Transitions. Les appariements anormaux que nous venons de décrire mènent à des **mutations dites de transition** (figure 19-3) ; une purine est remplacée par une purine ou une pyrimidine par une autre pyrimidine (tableau 19-1). L'ADN-polymérase III bactérienne (chapitre 11) a une activité correctrice qui perçoit ces mauvais appariements et les excise, ce qui réduit considérablement la formation de mutations. Un autre système de réparation, qui sera décrit plus loin dans ce chapitre, corrige un grand nombre des mauvais appariements qui ont échappé à l'activité correctrice de la polymérase.

Transversions. Les **mutations de transversion** qui substituent une pyrimidine à une purine, et vice-versa, ne peuvent être produites par de mauvais appariements, tels que ceux décrits dans la figure 18-2. Si les bases sont correctement orientées dans l'ADN, la création d'une transversion par une erreur de réplication nécessiterait qu'à un certain moment, une purine s'apparie à une autre purine, ou une pyrimidine à une autre pyrimidine. Bien que la structure de la double hélice défavorise ce type de mauvais appariement pour des raisons énergétiques, des études par diffraction de rayons X montrent que des paires G–A ou d'autres paires de purines peuvent se former.

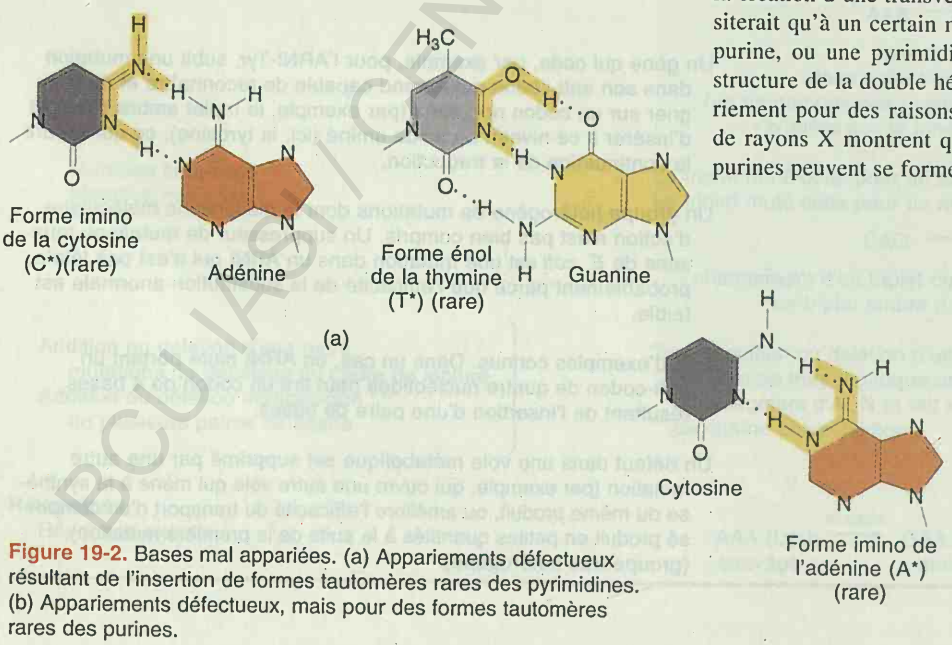


Figure 19-2. Bases mal appariées. (a) Appariements défectueux résultant de l'insertion de formes tautomères rares des pyrimidines. (b) Appariements défectueux, mais pour des formes tautomères rares des purines.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

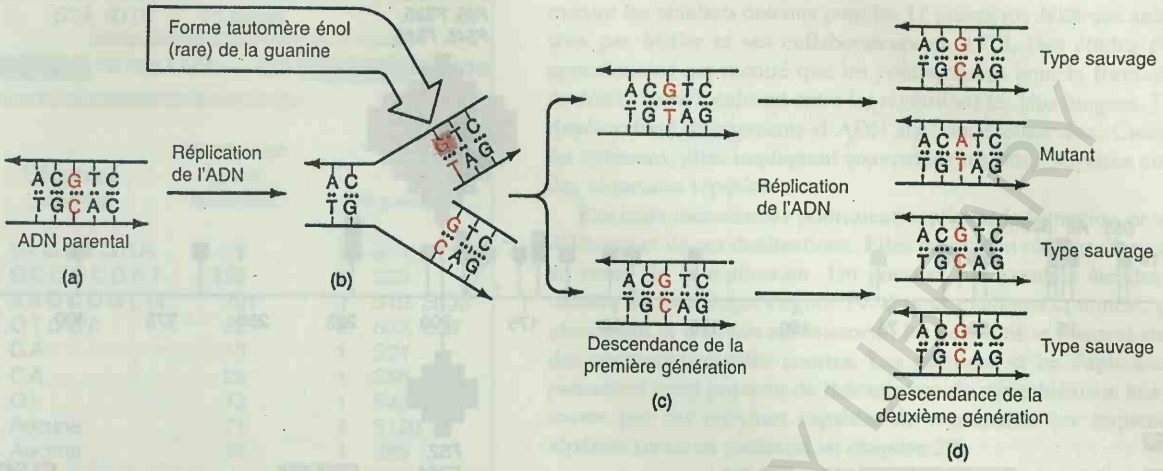


Figure 19-3. Formation de mutation par commutation entre formes tautomères des bases de l'ADN. (a) Une guanine prend la forme énol (G*) au moment de la réplication. (b) Sous sa forme énol cette guanine s'apparie à une thymine stable. (c) et (d) Au cours de la réplication suivante, la guanine reprend la forme la plus courante (céto), mais la thymine incorporée en face de la forme énol s'apparie à une adénine. Le résultat final est une mutation GC → AT. Si la transition de la forme céto vers la forme énol se fait au moment de l'incorporation (sous forme de nucléoside triphosphate) et non dans la chaîne parentale comme on l'a représenté sur la figure, la forme anormale sera incorporée en face d'une thymine. Il en résultera une mutation AT → GC. (D'après E.J. Gardner et D.P. Snustad, *Principles of Genetics*, 5ème éd. Copyright © 1984 par John Wiley & Sons, New York.)

MUTATIONS DE PHASE. (ou de de glissement du cadre de lecture). Ce sont également des erreurs de réplication qui mènent à la formation des **mutations de phase**. Rappelez-vous qu'au chapitre 13, nous avons vu que ce type de mutation altère sévèrement les protéines.

Au milieu des années 1960, George Streisinger et ses collaborateurs ont déterminé, dans le gène de structure du lysozyme du phage T4, la séquence nucléotidique aux alentours de différents sites de mutations de phase. Ils trouvèrent que souvent ces mutations apparaissaient au niveau de séquences répétées et, à partir de cette observation, formulèrent un modèle qui expliquerait la formation de mutations de phase au cours de la réplication de l'ADN. Dans le modèle de Streisinger (figure 19-4), des changements de phase apparaissent lorsque des boucles monocaténaires se forment et sont stabilisées par un «appariement décalé» des séquences répétées.

Lorsque les techniques de détermination de la séquence nucléotidique furent disponibles, dans les années 1970, Jeffrey Miller et ses collaborateurs examinèrent les points chauds de mutation dans le gène *lacI* de *E. coli*. (Nous avons vu, au chapitre12, qu'en 1961 Benzer démontrait l'existence de tels points chauds, c'est-à-dire de sites qui mutent beaucoup plus fréquem-

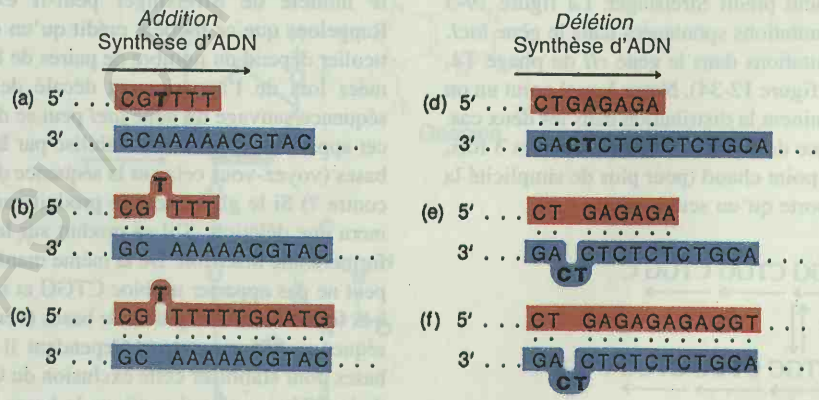


Figure 19-4. Version simplifiée du modèle de Streisinger qui explique la formation de mutations de phase. (a) à (c) Au cours de la synthèse d'ADN, la chaîne néosynthétisée glisse sur la chaîne matrice en provoquant l'extrusion d'une boucle de quelques bases. La boucle est stabilisée grâce à l'appariement assuré au sein de la séquence répétée (des A dans le cas illustré ici). Lors de la réplication, il y aura addition d'une paire A–T. (d) à (f) Si, par contre, c'est la chaîne matrice qui glisse, il y aura formation d'une délétion. Ici c'est un dinucléotide C–T qui constitue l'unité répétée. Le glissement provoquera la délétion de deux paires de bases à la réplication suivante.

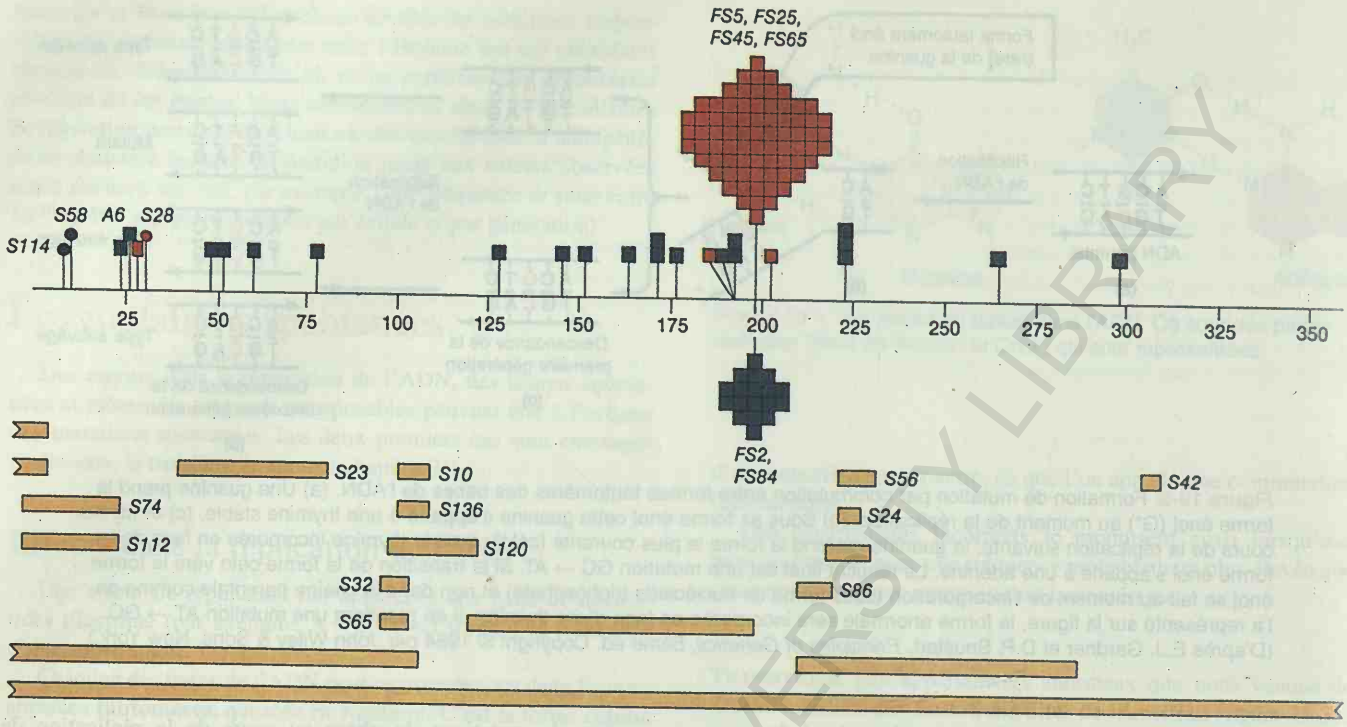
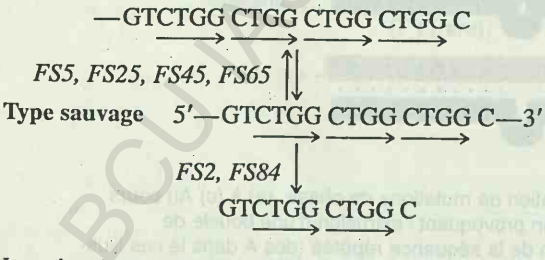


Figure 19-5. Distribution de 140 mutations spontanées dans le gène *lacI* d'*E. coli.* Un carré représente l'apparition d'une mutation ponctuelle. Les carrés rouges correspondent à des mutations à haute fréquence de réversion. Les délétions sont représentées en jaune dans le bas de la carte du gène *I* qui est graduée en termes d'acides aminés de la protéine correspondante, le répresseur *lacI*. Les numéros d'allèles font référence aux mutations qui ont été analysées au niveau de la séquence nucléotidique. Les mutations *S114* et *S58* (cercles) résultent de l'insertion d'un élément transposable (voir chapitre 21). La mutation *S28* (cercle rouge) est une duplication de 88 paires de bases. (D'après P.J. Farabaugh, U. Schmeissner, M. Hofer et J.H. Miller, *Journal of Molecular Biology* 126, 1978, 847-857.)

ment que d'autres). Le travail sur le gène *lacI* a montré que certains des points chauds résultent de la présence de séquences répétées, comme l'avait justement prédit Streisinger. La figure 19-5 montre la distribution des mutations spontanées dans le gène *lacI*. Comparez-la à celle des mutations dans le gène *rII* du phage T4, décrites par Benzer (voir la figure 12-34). Notez à quel point un ou deux sites mutationnels dominent la distribution dans les deux cas. Dans *lacI*, c'est une séquence de 4 paires de bases répétées 3 fois, en tandem, qui constitue le point chaud (pour plus de simplicité la séquence indiquée ne comporte qu'un seul brin) :



Le point chaud majeur, représenté ici par les mutations *FS5, FS25, FS45* et *FS65*, résulte de l'addition des quatre bases CTGG dans l'un des brins de l'ADN. Ces mutations réversent aussi à haute fréquence par la perte des 4 bases insérées. Le point chaud mineur, représenté par les mutations *FS2* et *FS84*, résulte de la perte d'un bloc CTGG. Ces mutants-là ne peuvent pas facilement récupérer les 4 bases perdues et, en conséquence, ne réversent pas. Comment le modèle de Streisinger peut-il expliquer ces résultats ? Rappelons que ce modèle prédit qu'un changement de phase particulier dépend du nombre de paires de bases qui peuvent être formées lors de l'appariement décalé des séquences répétées. La séquence sauvage du gène *lacI* peut se décaler d'un bloc CTGG et cet appariement peut être stabilisé par la formation de 9 paires de bases (voyez-vous cela sur la séquence du gène *lacI* de la figure ci-contre ?) Si le glissement se produit sur le brin matrice, il se formera une délétion. S'il se produit sur le brin néo-synthétisé, il se formera une insertion. De la même manière, le mutant par addition peut ne pas apparier un bloc CTGG et stabiliser cette forme grâce à la formation de 13 paires de bases (vérifiez ceci à nouveau sur la séquence *FS5* ci-contre). Cependant il n'y a que cinq paires de bases pour stabiliser cette exclusion du CTGG lors de la formation de la délétion, ce qui explique la basse fréquence de réversion de mutations telles que *FS2*.

Délétions et duplications. Comme on peut le voir sur la figure 19-5, les grandes **délétions** (de plus de quelques paires de bases) représentent une part importante des mutations spontanées. La séquence nucléotidique de délétions de plusieurs milliers de paires de bases a été étudiée. La plupart de ces délétions (mais pas toutes) se produisent entre de courtes séquences répétées. La figure 19-6

BCU STRAL UNIVERSITY LIBRARY

S74, S112 75 bases

CAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACC------CGCGTGGTGAACCAGG

Site (n° de pb)	Séquence répétée	Nombre de bases éliminées	Fréquence	
20 à 95	GTGGTGAA	75	2	*S74, S112*
146 à 269	GCGGCGAT	123	1	*S23*
331 à 351	AAGCGGCG	20	2	*S10, S136*
316 à 338	GTCGA	22	2	*S32, S65*
694 à 707	CA	13	1	*S24*
694 à 719	CA	25	1	*S56*
943 à 956	G	13	1	*S42*
322 à 393	Aucune	71	1	*S120*
658 à 685	Aucune	27	1	*S86*

Figure 19-6. Délétions dans *lacI*. Les délétions *S74* et *S112* sont indiquées par les barres situées au sommet de la figure. L'une des séquences répétées et la séquence interne sont éliminées. Il reste une copie de la séquence répétée. Toutes les mutations ont été analysées par séquençage nucléotidique. (D'après P.J. Farabaugh, U. Schmeissner, M. Hofer et J.H. Miller, *Journal of Molecular Biology* 126, 1978, 847-857.)

montre les résultats obtenus pour les 12 premières délétions analysées par Miller et ses collaborateurs en 1978. Des études plus approfondies ont montré que les points chauds pour la formation de délétions se localisent entre les répétitions les plus longues. Des **duplications** de segments d'ADN sont aussi observées. Comme les délétions, elles impliquent souvent les régions comprises entre des séquences répétées.

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer la formation de ces délétions et de ces duplications. Elles pourraient résulter d'erreurs au cours de la réplication. On pourrait par exemple étendre le modèle de Streisinger (figure 19-4) pour expliquer comment, par glissement et mauvais appariement, les délétions se forment entre des séquences répétées courtes. Les délétions et les duplications pourraient aussi provenir de mécanismes de recombinaison mis en œuvre par des enzymes capables de reconnaître ces séquences répétées (nous en parlerons au chapitre 20).

Les lésions spontanées

Outre les erreurs de réplication, des **lésions spontanées** qui se produisent naturellement dans l'ADN peuvent provoquer l'apparition de mutations. Les lésions spontanées les plus fréquentes sont la dépurination et la désamination. La **dépurination** est la plus fréquente des deux. Un résidu guanine ou cytosine est perdu par la chaîne d'ADN suite à la rupture du lien glycosidique entre le désoxyribose et la base (figure 19-7). A 37° C, une cellule animale perd environ 10 000 purines de son ADN en une génération (c'est-à-dire en 20 heures). Si ces lésions persistaient, la cellule subirait de graves dommages génétiques étant donné qu'au niveau de ces **sites apuriniques,** à la réplication suivante de l'ADN, il ne serait pas possible d'insérer la base complémentaire de la purine originale. Nous verrons plus loin qu'il existe heureusement, dans la cellule, des mécanismes qui éliminent ces sites apuriniques.

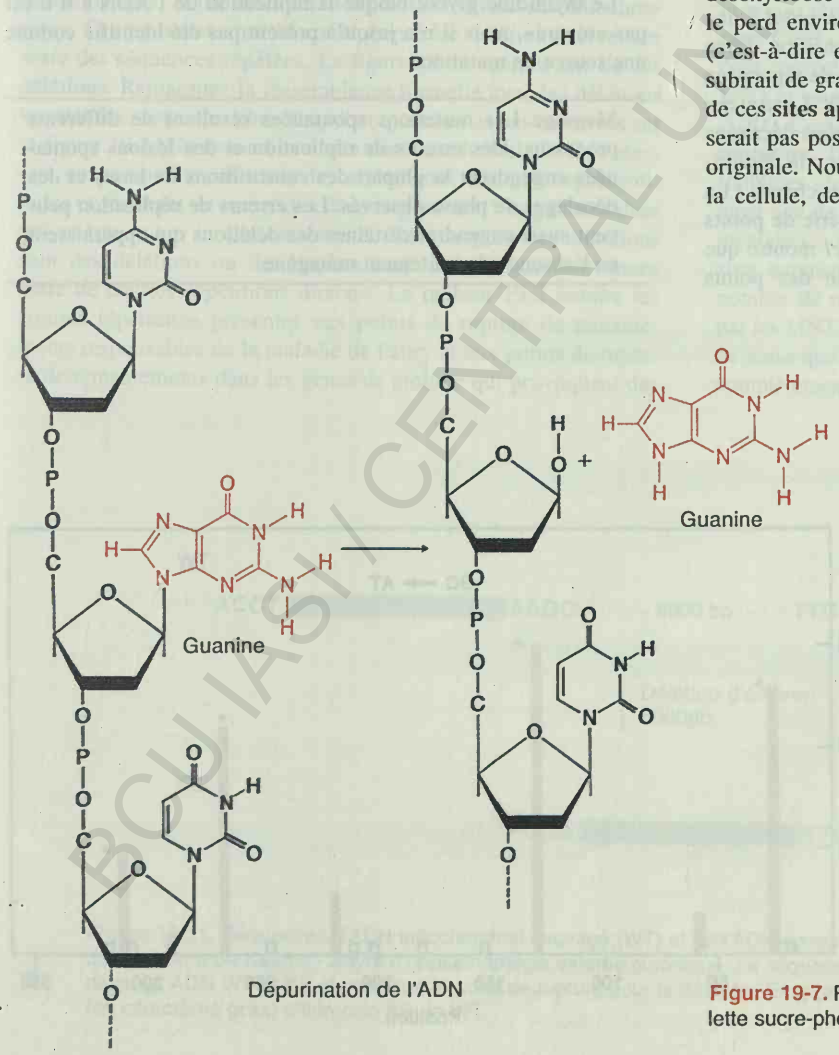


Figure 19-7. Perte d'un résidu purine dans un brin d'ADN. Le squelette sucre-phosphate reste intact.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

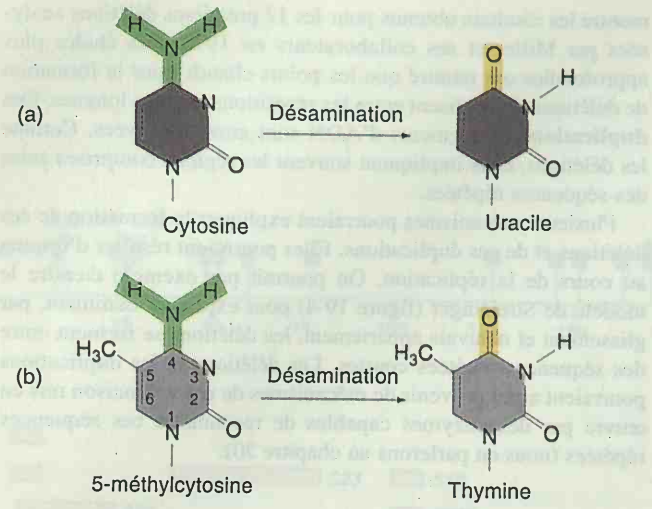


Figure 19-8. Désamination d'une cytosine (a) et d'une 5-méthyl-cytosine (b).

Dans certaines conditions (que nous décrirons aussi plus loin), une base quelconque peut être insérée en face d'un site apurinique ce qui entraîne le plus souvent une mutation.

La **désamination** des cytosines donne lieu à la formation d'uraciles (figure 19-8a). Les uraciles non réparés s'apparieront à une adénine lors de la réplication. Il en résultera la transition d'une paire G - C vers une paire A - T. L'une des enzymes de réparation de la cellule reconnaît, et excise, les uraciles de l'ADN. Le trou qui en résulte est ensuite comblé, par un processus que nous décrirons plus tard. En 1978, fut faite une découverte excitante : la désamination est responsable de l'existence de certains points chauds ! La détermination de la séquence nucléotidique d'une série de points chauds de transitions GC → AT au sein du gène *lacI* montre que des résidus 5-méthylcytosine occupent la position des points chauds. (Certaines bases de l'ADN des eucaryotes et des procaryotes sont méthylées ; voir p. 421). La figure 18-9 reprend certains résultats de cette étude. La hauteur de chacune des barres du graphique représente la fréquence de mutation au niveau de quelques sites. On voit la corrélation entre la présence de 5-méthylcytosines et la position des sites les plus instables. La désamination des 5-méthylcytosines produit des thymines (5-méthyluracile) (figure 19-8b) qui ne sont pas reconnues par l'uracile-ADN-glycosylase et donc ne sont pas réparées. En conséquence les transitions C → T produites à la suite de désaminations se rencontrent essentiellement en des sites 5-méthylcytosines. Une des conséquences de la mutation fréquente de la 5-méthylcytosine en thymine est la sous-représentation des dinucléotides CpG chez les organismes supérieurs. Cette séquence est en effet méthylée en 5-méthylCpG qui est progressivement muté en TpG.

Les **bases oxydées** constituent un troisième type de lésions spontanées impliquées dans la mutagénèse. Différents composés oxygénés très réactifs tels que les radicaux superoxydes ($O_2^{-\bullet}$), le peroxyde d'oxygène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles (•OH) sont produits par le métabolisme aérobie normal. Ils peuvent oxyder l'ADN et certains de ces précurseurs (dont le dGTP) et provoquent des mutations dont certaines sont à l'origine de maladies humaines. La figure 19-10 montre deux lésions produites par l'oxydation de bases nucléiques. La 8–oxo–7,8–dihydrodésoxyguanine (8–oxodG ou «GO») s'apparie fréquemment avec A, ce qui provoque un taux d'apparition élevé de transversions G → T.

Le thymidine glycol bloque la réplication de l'ADN s'il n'est pas «réparé», mais il n'a jusqu'à présent pas été identifié comme une source de mutation.

Message Les mutations spontanées résultent de différents processus. Des erreurs de réplication et des lésions spontanées engendrent la plupart des substitutions de bases et des décalages de phase observés. Les erreurs de réplication peuvent aussi engendrer certaines des délétions qui apparaissent en l'absence de traitement mutagène.

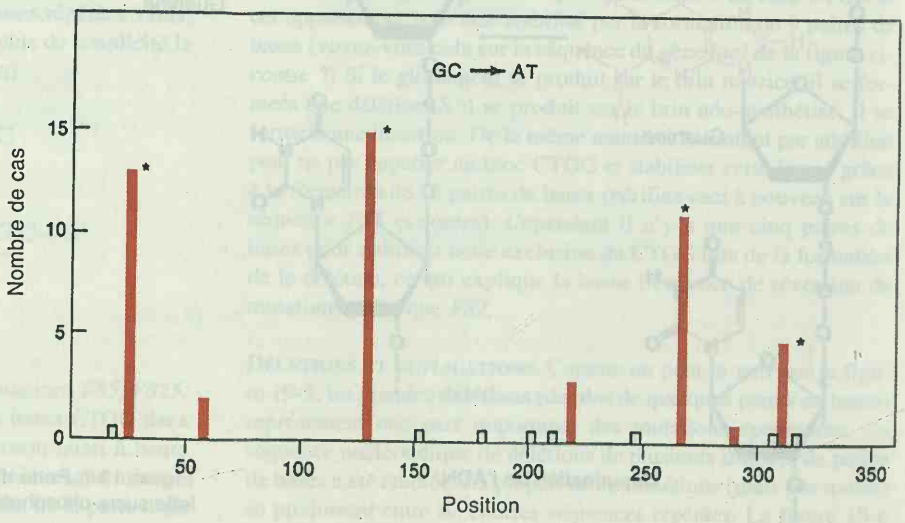
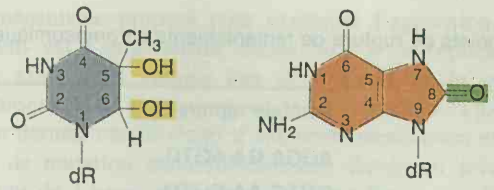


Figure 19-9. Points chauds dus à la présence de 5-méthylcytosine chez *E.coli*. La formation de mutations non-sens en 15 sites du gène *lacI* a été étudiée. Toutes résultent d'une transition GC → AT. Les astérisques (*) marquent les positions des 5-méthylcytosines. Les barres creuses marquent les sites auxquels des mutations GC → AT auraient pu apparaître mais n'ont pu être détectées dans l'expérience décrite. Il ressort clairement de la figure que les 5-méthylcytosines sont des points chauds de transitions GC → AT. Parmi 50 mutations indépendantes, 44 se retrouvent au niveau des quatre 5-méthylcytosines alors que 11 seulement sont localisées au niveau des cytosines non méthylées. (D'après Coulondre et al., *Nature* 274, 1978, 775-780.)



Thymidine glycol — 8–oxo–7,8–dihydrodésoxyguanine (8–oxodG)

Figure 19-10. Altérations de l'ADN résultant de l'attaque par des radicaux oxygène. dR = désoxyribose.

Mutations spontanées et maladies humaines

L'analyse de séquences d'ADN permet d'identifier les mutations responsables de plusieurs maladies humaines héréditaires. Les connaissances acquises par l'étude de la mutagénèse bactérienne permettent de formuler des hypothèses quant aux mécanismes qui provoquent ces maladies chez l'Homme.

Plusieurs de ces maladies sont dues à des **délétions** ou à des **duplications** de régions d'ADN comprises entre des séquences répétées. C'est le cas des encéphalomyopathies mitochondriales, un groupe de maladies affectant le système nerveux central ou les muscles. Elles se caractérisent par un dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative (une des fonctions effectuées par les mitochondries) et par des altérations de la structure des mitochondries. Ces maladies sont la conséquence de délétions survenues entre des séquences répétées. La figure 19-11 montre une de ces délétions. Remarquez la ressemblance formelle avec les délétions spontanées survenues chez *E. coli* et que nous avons montrées sur la figure 19-6. Un second exemple concerne la maladie de Fabry, une enzymopathie affectant le catabolisme des glycosphingolipides et résultant de mutations dans le gène de l' α–galactosidase qui se trouve sur le chromosome X. Beaucoup de ces mutations sont des délétions ou des duplications intragéniques survenues entre de courtes répétitions directes. Le tableau 19-2 montre les courtes répétitions présentes aux points de rupture de remaniements responsables de la maladie de Fabry et aux points de rupture de remaniements dans les gènes de globine qui provoquent des anémies et des thalassémies. Tous ces remaniements résultent d'appariements décalés entre les séquences répétées comme sur la figure 19-4 ou d'une recombinaison entre les séquence répétées.

Un phénomène responsable de l'apparition de nombre de maladies génétiques est l'**expansion d'un motif répété de 3 paires de bases.** Il provoque notamment le syndrome de l'X fragile (figure 19-12). Ce syndrome est une des formes les plus courantes d'arriération mentale qui se rencontre chez un homme sur 1500 et chez 1 femme sur 2500. Il se manifeste cytologiquement par la présence d'un site fragile sur le chromosome X où se produit une cassure in vitro. La transmission de l'X fragile est quelque peu inhabituelle parce que 20 pour cent environ des hommes porteurs d'un chromosome X fragile sont phénotypiquement normaux mais transmettent ce X à leurs filles qui sont elles-mêmes phénotypiquement normales. Ces hommes sont appelés des «mâles normaux transmetteurs» (MNT). Cependant, les fils des filles des MNT présentent fréquemment les symptômes. Le syndrome de l'X fragile provient de mutations dans une série de répétitions du motif CGG présente dans la région codante du gène *FMR-1*. Chez les personnes atteintes, la mutation induit la méthylation spécifique d'un îlot CpG voisin, ce qui a pour effet de réduire l'expression de *FMR-1*.

Pourquoi les symptômes apparaissent-ils chez certaines personnes porteuses d'un X fragile et pas chez d'autres ? La réponse se trouve dans le nombre de répétitions du motif CGG présentes dans le gène *FMR-1*. Ce nombre varie normalement entre 6 et 54, l'allèle le plus répandu en contient 29. A cette variation du nombre de triplets CGG correspond une variation du nombre de résidus arginine dans la protéine codée par *FMR-1* (CGG est un codon arginine). Les MNT et leurs filles ont un nombre plus élevé de répétitions, entre 50 et 200. Ce nombre accru de répétitions correspond à un état de **prémutation**. Tous les allèles prémutés sont instables. Les individus (hommes ou femmes) qui présentent les symptômes de la maladie ainsi que de nombreuses femmes porteuses ont des copies supplémentaires : de 200 à 1300. On a montré que la probabilité d'expansion augmente avec le nombre de répétitions. Apparemment, le nombre de répétitions que contiennent les allèles prémutés portés par les MNT et par leurs filles se situe au-dessus d'un seuil critique, de sorte que la probabilité d'une expansion qui produira un allèle complètement muté est élevée.

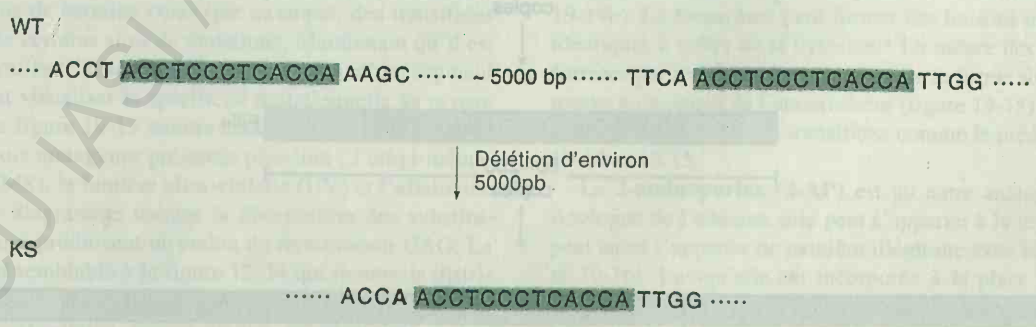


Figure 19-11. Séquences d'ADN mitochondrial sauvage (WT) et de l'ADN contenant une délétion provenant d'un patient atteint du syndrome de Kearns - Sayre d'ophtalmoplégie externe chronique. La séquence de 13 pb indiquée en vert est identique dans les ADN WT et KS et constitue le point de rupture pour la délétion. En plus de la délétion, une seule substitution de base (en caractères **gras**) différencie KS de WT.

BCU IASI / CENTRE UNIVERSITAIRE

Tableau 19-2. Courtes répétitions directes dans les séquences avoisinant les points de rupture de remaniements chromosomiques impliqués dans des maladies génétiques chez les mammifères

Remaniement	Point de rupture 5'	Point de rupture 3'
Hb Leyde	TC**CTG**AG **GA** G	AGGA **GA** AGTC
Hb Lyon	GGGC **AA** GGTGG	GGTG **AA** CGTG
Hb Fribourg	TGAA **GT** TGGT	GTTG **GT** GGTG
Hb Niteroi	CGTT **CTTTG** AGTC	AGTC **CTTTG** GGGA
Hb Gun Hill	AGTG **AGCTGCA** CTGT	GACA **AGCTGCA** CGTG
Hb Tochigi	TATG **GG** CAAC	CTAA **GG** TGAA
Hb St Antoine	TGAT **GGC** CTGG	GC**CT GGC** TCAC
Hb Coventry	TAAT **GCCC** TGGC	C**CTG GCCC** ACAA
$\gamma\beta\delta$–Thal1	TCC**C AG** CACT	GAAA **AG** TCTG
Hb BK	GGTA **TCT** GGAG	AATT **TCT** ATTA
HPFH indienne	CGCG **CCACT** GCAC	ATCC **CCACT** ATAT
β^0–Thal hollandaise	AACC **AAATTT** GCAC	GAGA **AAATTT** TTGC
β–Thal turque	GTCT **ACCC** TTGG	TTGG **ACCC** AGAG
$-(\alpha)^{20.5}$	CCTA **GGC** AACA	TAAG **GGC** CACG
RB 1	AGCT **TTTATAC** TTGA	TGAA **TTTAAAC** ATAA
Pro–α2(I)	TTTC **TTTC** TAAG	TGAA **TTTC** CCTG
Fabry, famille A	GAAC **CCA** GAAC	AGCT **CCA** CCTC
Fabry, famille B	CATC **AAG** GGTA	TTAA **AAG** ACTT
Fabry, famille D	AGCT **TAGACA** GGTA	AATG **TAGATA** AAGA
Fabry, famille E	CAGC **AGAACT** GGGG	GGAA **AGAACT** TTGA
Fabry, famille J	TTTA **AC** CAGG	TAAT **AC** ATTT
	GAAA **AT** TTT	ATGT **AT** AGGC

NOTE : Les points de rupture 5' et 3' de chaque remaniement génique sont montrés. Des espaces séparent les répétitions directes (en **grasses**) et les quatre nucléotides adjacents en 5' et en 3' qui peuvent participer à un événement de recombinaison. Les tétranucléotides CTGG/CCAG et les trinucléotides CTG/CAG sont mis en évidence. Hb = hémoglobine ; Thal = thalassémie.

SOURCE : R. Kornreich, D.F. Bishop et R.J. Desnick, *Journal of Biological Chemistry* **2**, 1990, 9319.

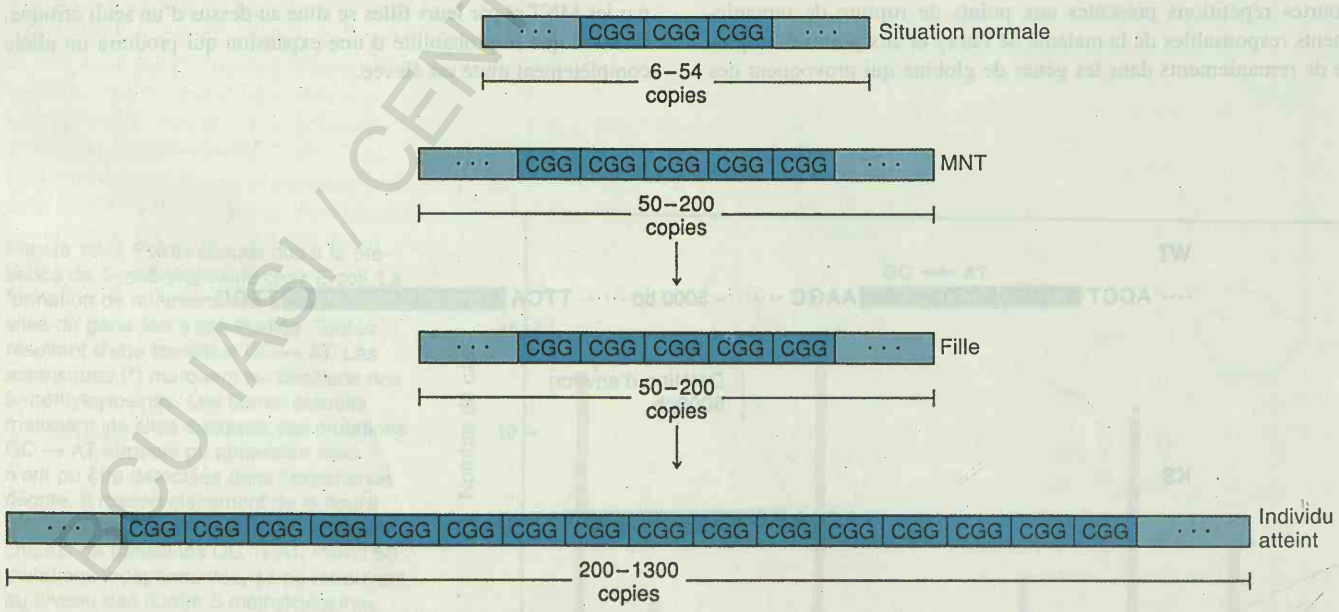


Figure 19-12. Amplification du triplet CGG dans le gène *FMR-1*, à l'origine du syndrome du X fragile. Les individus normaux ont de 6 à 54 répétitions du triplet CGG, tandis que les individus des familles à risque présentent une augmentation (correspondant à une prémutation) du nombre de répétitions. Les mâles normaux transmetteurs (MNT) et leurs filles ont un phénotype normal, mais ils ont de 50 à 200 copies du triplet CGG. Ce nombre varie de 200 à 1300 chez les individus qui présentent les symptômes complets de la maladie.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Le mécanisme proposé pour expliquer l'apparition de ces répétitions est l'appariement décalé lors de la réplication de l'ADN, exactement comme lors de l'expansion du motif de quatre bases CTGG au point chaud de *lac I* montré à la page 588. Dans ce dernier cas, il s'agit d'une seule duplication et la fréquence de mutation extraordinairement élevée au niveau des répétitions de 3 bases observée dans le syndrome de l'X fragile suggère que la machinerie de réplication des cellules humaines est incapable d'assurer une réplication fidèle au-dessus d'un seuil de 50 répétitions.

Une autre maladie héréditaire, l'atrophie musculaire spinale et bulbaire liée à l'X (connue sous le nom de maladie de Kennedy), résulte aussi de l'amplification d'un motif répété de trois bases ; dans ce cas, il s'agit d'un triplet CAG. La maladie de Kennedy qui se caractérise par un affaiblissement musculaire progressif suivi d'atrophie, provient d'une mutation dans le gène du récepteur d'androgène. Les individus normaux ont en moyenne 21 répétitions du motif CAG dans ce gène, alors que les malades en ont de 40 à 52.

La dystrophie myotonique, qui est la forme la plus commune de dystrophie musculaire chez l'adulte, est un autre exemple de maladie provoquée par une expansion de séquence. Les familles atteintes présentent des symptômes dont la sévérité va croissant chez les générations successives ; ceci est dû à l'amplification progressive d'un triplet CTG à l'extrémité 3' d'un transcrit. Les individus normaux possèdent en moyenne 5 répétitions du motif CTG ; les individus faiblement atteints ont environ 50 copies et les malades gravement atteints en ont plus de 1000.

D'autres cas de maladies provoquées par des expansions de séquence continuent d'être découverts. La chorée de Huntington vient d'être ajoutée à la liste.

Mutagénèse induite

Spécificité mutationnelle

Les mutations induites ont joué un rôle essentiel dans l' analyse génétique. Si l'on examine la distribution des mutations induites par différents mutagènes, on remarque une spécificité, caractéristique de chacun d'entre eux. Cette **spécificité mutationnelle** a été observée pour la première fois en 1961 par Benzer, dans le système *rII*. La spécificité se marque par une préférence, à la fois de certains *types* (par exemple, des transitions GC → AT) et de certains *sites* de mutations. Maintenant qu'il est facile de déterminer la séquence nucléotidique d'un segment d'ADN, on peut visualiser la spécificité mutationnelle au niveau moléculaire. La figure 19-13 montre cette spécificité dans le cas de *lacI*, pour trois mutagènes présentés plus loin : l'éthyl-méthane sulfonate (EMS), la lumière ultra-violette (UV) et l'aflatoxine B_1 (AFB_1). Le diagramme montre la distribution des substitutions de bases qui produisent un codon de terminaison UAG. La figure 19-13 est semblable à la figure 12-34 qui montre la distribution des mutations dans *rII*, mais ici, la séquence nucléotidique de chaque site est connue, ce qui permet de subdiviser le diagramme en catégories de substitutions.

La figure 19-13 met en évidence deux composantes de la spécificité mutationnelle. D'abord chacun des mutagènes représentés montre une préférence pour un type donné de substitution. L'EMS, par exemple, favorise les transitions GC → AT alors que l'AFB_1 favorise les transversions GC → TA. Ceci résulte de l'existence de différents mécanismes de mutagénèse. Ensuite, même au sein d'une même catégorie, il y a de grandes variations des taux de mutations. C'est particulièrement frappant pour les changements GC → AT induits par les UV. Ce sont probablement les séquences d'ADN avoisinantes qui sont responsables de ces différences. Comme nous l'avons décrit pour des résidus 5-méthylcytosine et pour certaines mutations de phase (figures 19-5 et 19-9), dans certains cas, la cause de l'existence d'un point chaud de mutation peut être révélée par l'inspection de la séquence des nucléotides. Cependant, dans de nombreux cas de points chauds de mutagénèse induite, on ne connaît pas la raison précise de la forte mutabilité ou de la mauvaise réparation de ces sites.

Mécanismes de mutagénèse

Les mutagènes induisent les mutations par au moins trois mécanismes différents. Il y a soit remplacement d'une base de l'ADN, soit altération d'une base de telle sorte qu'elle s'apparie de manière spécifique mais illégitime avec une autre base, soit enfin détérioration d'une base qui de ce fait ne peut plus s'apparier dans des conditions normales.

Incorporation d'analogues de bases. Certains agents chimiques ont des structures suffisamment voisines de celles des bases azotées de l'ADN pour pouvoir être à l'occasion incorporés dans la chaîne nucléotidique en lieu et place d'une telle base. Ces agents sont appelés des **analogues de base.** Une fois en place, ils ont des propriétés d'appariement différentes de celles des bases normales. Ils causent des mutations en provoquant l'insertion d'un nucléotide incorrect en vis-à-vis lors de la réplication. L'analogue n'est présent que sur l'un des brins de la double hélice, mais il peut causer une substitution qui sera recopiée sur tous les ADN descendants de ce brin ancestral.

Prenons un exemple. Le **5-bromo-uracile (5-BU)** est un analogue de la thymine qui porte un atome de brome et non un CH_3 en position C-5. Ce changement n'affecte pas les atomes qui participent à des liaisons hydrogène lors de l'appariement de bases, mais la présence du brome modifie la distribution des électrons dans la base. La forme céto du 5-BU qui s'apparie normalement avec l'adénine (figure 19-14a) se modifie spontanément en forme énol ou en forme ionisée à une fréquence relativement élevée (figure 19-14b). La forme énol peut former des liaisons hydrogène quasi-identiques à celles de la cytosine ! La nature des paires de bases formées par le 5-BU dépendra donc de la forme sous laquelle il se trouve au moment de l'appariement (figure 19-15). Le 5-BU cause presque uniquement des transitions comme le prédisent les figures 19-14 et 19-15.

La **2-aminopurine (2-AP)** est un autre analogue très utilisé. Analogue de l'adénine, elle peut s'apparier à la thymine mais elle peut aussi s'apparier de manière illégitime avec la cytosine (figure 19-16). Lorsqu'elle est incorporée à la place de l'adénine et s'apparie à la cytosine, elle peut engendrer des transitions AT → GC, lors de la réplication. Si elle est incorporée par appariement illégitime avec une adénine, il se produira une transition GC → AT. Les études génétiques ont confirmé que la 2-AP provoque essentiellement des transitions.

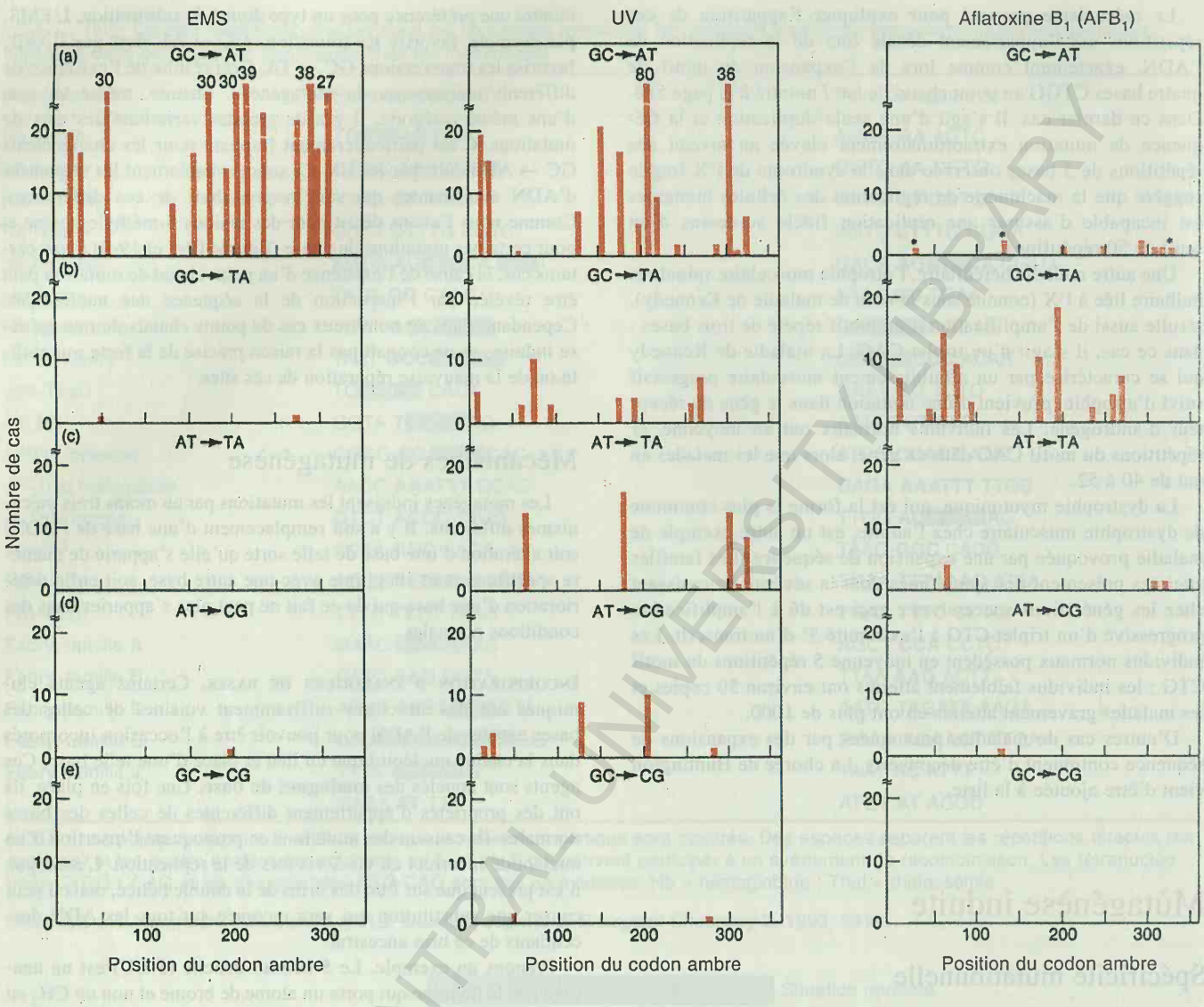
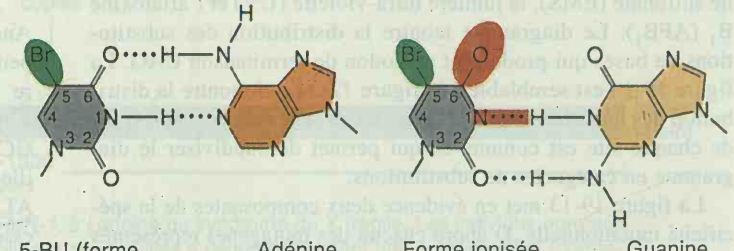


Figure 19-13. Spécificité des mutagènes. La figure illustre la distribution des mutations induites à 36 sites dans le gène *lacI* par 3 mutagènes : l'EMS, la lumière UV et l'aflatoxine B_1. La hauteur des barres représente le nombre d'événements mutationnels apparus aux différents sites. Certains points chauds ne sont pas à l'échelle et sont représentés par des chiffres, au sommet de la barre. Dans la collection induite par les UV par exemple, une transition GC → AT est retrouvée 80 fois au même site. Chacun des événements mutationnels montrés dans la figure fait apparaître un codon ambre (UAG) dans l'ARN messager. Les mutations sont rangées selon le type d'événement mutationnel impliqué. Les astérisques marquent les positions de 5-méthylcytosines. (Reproduit d'après C. Coulondre et J.H. Miller, *Journal of Molecular Biology* 117,1977, 577-606 ; et P.L. Foster et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA,* 80, 1983, 2695-2698).

IAS - CENTRAL UNIVERSITY - LIBRARY

Figure 19-4. Alternative pour l'appariement du 5-bromo-uracile (5-BU). Le 5-BU est un analogue de la thymine qui peut être incorporé par erreur dans la chaîne d'ADN. Il porte un brome à la place du groupe méthyle. (a). Dans sa conformation normale céto, il imite les propriétés d'appariement de la thymine et forme une paire avec l'adénine. (b) La présence de l'atome de brome provoque une redistribution des électrons qui aboutit à la présence plus fréquente de la forme ionisée. Dans cet état-là, le 5-BU imite la cytosine et s'apparie à la guanine, provoquant une mutation au cours de la réplication.



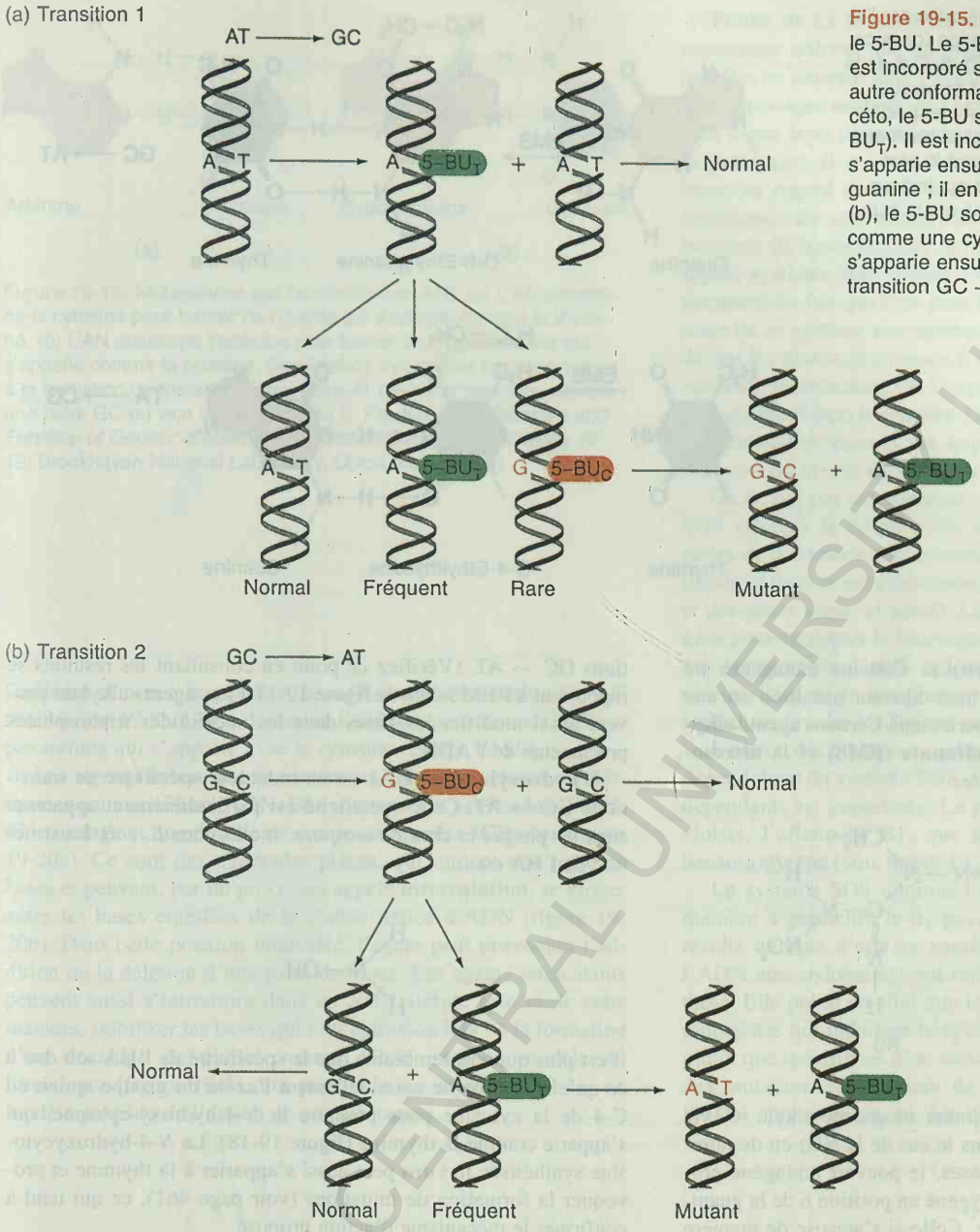


Figure 19-15. Mécanisme de la mutagénèse par le 5-BU. Le 5-BU provoque des mutations lorsqu'il est incorporé sous une forme, puis prend une autre conformation. (a) Sous sa forme normale céto, le 5-BU s'apparie comme la thymine (5-BU_T). Il est incorporé en face d'une adénine et s'apparie ensuite de manière erronée avec une guanine ; il en résulte une transition AT → GC. En (b), le 5-BU sous sa forme ionisée s'apparie comme une cytosine à une guanine (5-BU_C), mais s'apparie ensuite à une adénine ; il en résulte une transition GC → AT.

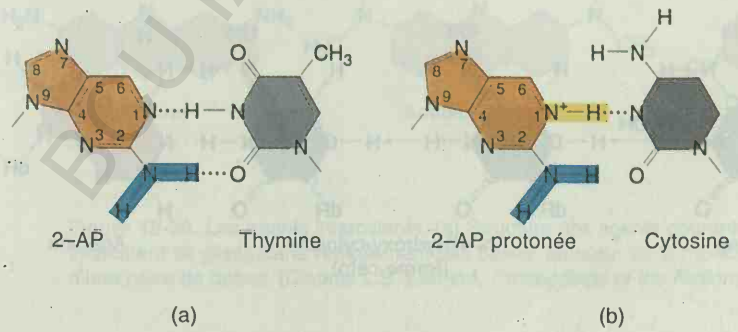


Figure 19-16. Appariements possibles de la 2–aminopurine (2–AP), un analogue de l'adénine. Normalement, la 2–AP s'apparie avec la thymine (a), mais sous sa forme protonée, elle peut s'apparier avec la cytosine (b).

BIU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBR

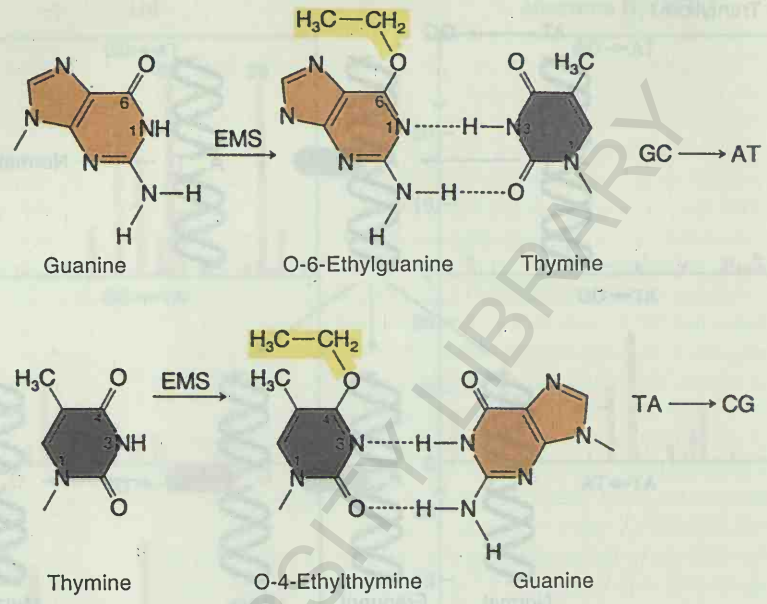
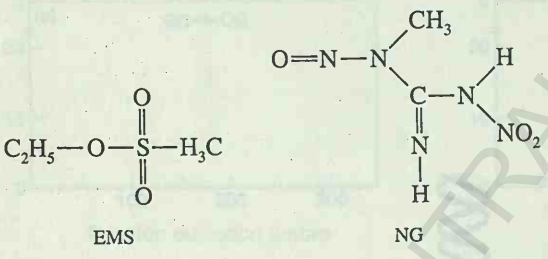


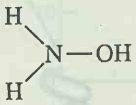
Figure 19-17. Erreur d'appariement induite par l'alkylation. La figure montre que l'alkylation (dans ce cas-ci, l'éthylation générée par l'EMS) du O-6 de la guanine et du O-4 de la thymine peut provoquer directement l'appariement erroné avec, respectivement, la thymine et la guanine. Chez les bactéries, l'analyse montre que les mutations sont le plus souvent des transitions GC → AT, ce qui indique que c'est l'alkylation de la guanine qui est la plus importante pour la mutagénèse.

Appariement illégitime spécifique. Certains mutagènes ne sont pas incorporés dans l'ADN mais altèrent une base en une forme qui provoque le mauvais appariement. Certains agents **alkylants,** comme l'**éthyl-méthane sulfonate (EMS)** et la **nitroso-guanidine (NG)**, opèrent de la sorte.



Bien que ces agents puissent ajouter un groupe alkyle (éthyle dans le cas de l'EMS, méthyle dans le cas de la NG) en de nombreuses positions sur les quatre bases, le pouvoir mutagène provient surtout de l'addition sur l'oxygène en position 6 de la guanine, qui forme la O-6-alkylguanine. Celle-ci s'apparie de manière illégitime avec la thymine (figure 19-17), ce qui provoque une transition GC → AT lors de la réplication suivante. Comme on pouvait s'y attendre, l'analyse de la spécificité mutationnelle de l'EMS et de la NG montre un préférence très nette pour les transitions GC → AT. (Vérifiez ce point en consultant les résultats se rapportant à l'EMS dans la figure 19-13.) Les agents alkylant peuvent aussi modifier les bases dans les nucléotides triphosphates précurseurs de l'ADN.

L'hydroxylamine (HA) est un inducteur spécifique de transitions GC → AT. Cette spécificité est particulièrement apparente chez les phages et chez *Neurospora,* moins chez *E. coli.* La structure de l'HA est :



Il est plus que vraisemblable que la spécificité de l'HA soit due à ce qu'elle hydroxyle essentiellement l'azote du groupe amino en C-4 de la cytosine pour produire la *N*-4-hydroxy-cytosine, qui s'apparie comme la thymine (figure 19-18). La *N*-4-hydroxycytosine synthétisée in vitro peut aussi s'apparier à la thymine et provoquer la formation de mutations (voir page 461), ce qui tend à confirmer le mécanisme d'action proposé.

Les **ions bisulfite** et l'**acide nitreux (AN)**, qui désaminent la cytosine en uracile, constituent d'autres exemples de mutagènes qui agissent en introduisant des modifications spécifiques de bases. Le résidu uracile, s'il n'est pas remplacé, s'appariera à

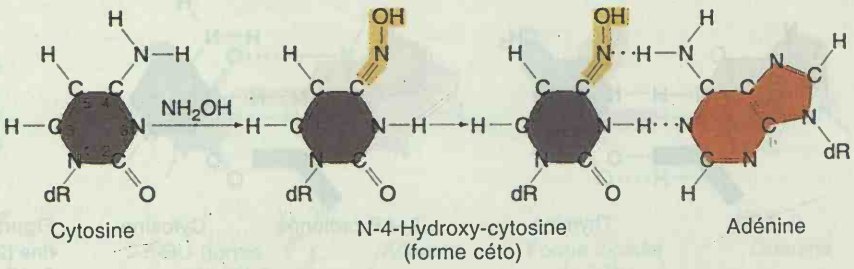


Figure 19-18. Une explication possible pour la spécificité GC → AT de l'hydroxylamine chez certains organismes. La cytosine est modifiée de manière à s'apparier comme la thymine. Il en résulte des transitions GC → AT (dR = désoxyribose).

UNIVERSITY LIBRARY

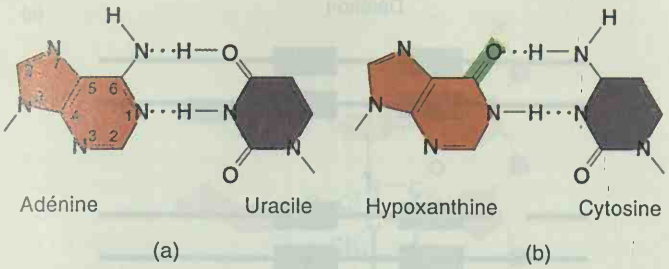


Figure 19-19. Mutagénèse par l'acide nitreux (AN). (a) L'AN désamine la cytosine pour former de l'uracile qui s'apparie comme la thymine. (b) L'AN désamine l'adénine pour former de l'hypoxanthine qui s'apparie comme la guanine. Ces liaisons incorrectes peuvent mener à la formation de mutations. Une paire AT peut, par exemple, devenir une paire GC ou vice versa. (D'après E. Freese, dans *Structure and Function of Genetic Elements,* Brookhaven Symposia in Biology, N° 12, Brookhaven National Laboratory, Upton, N.Y., 1959.)

l'adénine et non à la guanine, introduisant une transition C → T (voir figure 19-8). L'AN désamine l'adénine pour donner de l'hypoxanthine qui s'apparie avec la cytosine (figure 19-19).

Les **agents intercalants** constituent une autre classe de substances qui modifient l'ADN. Elle comprend la **proflavine**, l'**acridine orange** et une famille de composés appelés **ICR** (voir figure 19-20a). Ce sont des molécules planes, qui imitent une paire de bases et peuvent, par un processus appelé **intercalation**, se glisser entre les bases empilées de la double hélice d'ADN (figure 19-20b). Dans cette position intercalée, l'agent peut provoquer l'addition ou la délétion d'une paire de bases. Les agents intercalants peuvent aussi s'introduire dans un ADN simple brin et de cette manière, stabiliser les bases qui font extrusion lors de la formation d'un décalage de phase comme décrit dans le modèle de Streisinger (figure 19-4). On peut voir sur la figure 19-21, un modèle possible de l'action de ces substances.

Perte de la spécificité de l'appariement. Certains agents mutagènes altèrent une ou plusieurs bases voisines de telle sorte qu'elles ne peuvent plus s'apparier. Ce non-appariement, s'il subsiste, provoque un arrêt de la réplication qui ne peut procéder au-delà d'une base incapable de former des liaisons hydrogène avec sa partenaire. Il y a une bonne raison à celà. L'introduction de bases en regard d'une altération non codante produirait trop de mutations ! Le contournement (ou **by-pass**) d'un tel blocage par insertion de bases requiert la mise en route d'un système spécial, appelé **système SOS** (figure 19-22). Le terme SOS provient évidemment du fait que l'on peut faire une analogie entre la mise en route de ce système enzymatique et un appel à l'aide de la cellule devant les dommages causés à son ADN. (Cette induction est une véritable mobilisation de l'expression de gènes. Elle est décrite plus en détail dans le chapitre 18.) Le système SOS est pour la cellule un dernier recours par lequel elle négocie sa survie au prix d'un certain niveau de mutagénèse.

On ne sait pas actuellement avec précision comment le système SOS effectue le by-pass. On sait par contre qu'au moins trois gènes de la bactérie sont essentiels. Il s'agit du gène *recA* (qui est impliqué dans la recombinaison généralisée décrite au chapitre 20) et des gènes *umuC* et *umuD*. Les hypothèses couramment envisagées pour expliquer le fonctionnement du système SOS proposent que les protéines UmuC et UmuD s'associent avec l'ADN polymérase III dans le complexe de réplication pour en diminuer la fidélité au niveau des lésions non codantes.

L'action des mutagènes qui produisent des lésions non codantes dépend donc du système SOS. Cette catégorie de mutagènes SOS-dépendants est importante. La plupart des carcinogènes, les ultraviolets, l'aflatoxine B1, que nous examinerons plus loin et le benzo(a)pyrène (voir figure 19-26) en sont des exemples

Le système SOS diminue-t-il la fidélité de la réplication (de manière à permettre le by-pass des lésions) à tel point qu'il en résulte un taux d'erreurs anormalement élevé, même lorsque de l'ADN non endommagé est répliqué ? On peut tester cette hypothèse. Elle prédit en effet que les mutations induites par différents mutagènes qui induisent le système SOS devraient être similaires plutôt que spécifiques d'un mutagène particulier puisque la plupart des mutations résulteraient de l'action du système SOS sur de l'ADN non endommagé. Le rôle du mutagène serait seulement

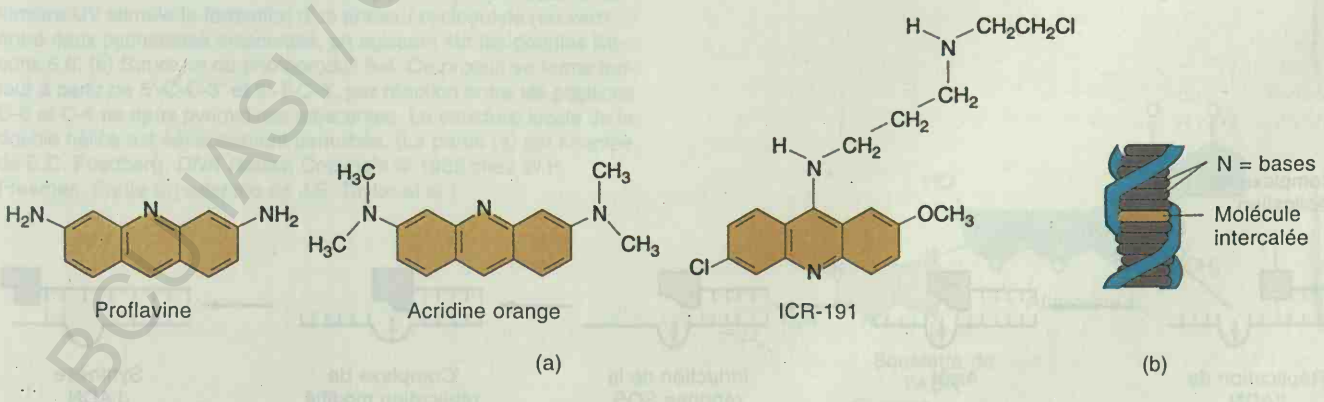


Figure 19-20. Les agents intercalants. (a) Structure des agents courants, proflavine, acridine orange et ICR-191. (b) Un agent intercalant se glisse dans l'empilement des bases, au cœur de la molécule d'ADN. Il peut en résulter l'addition ou la délétion d'une paire de bases. (D'après L.S. Lerman, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 49, 1963, 94).

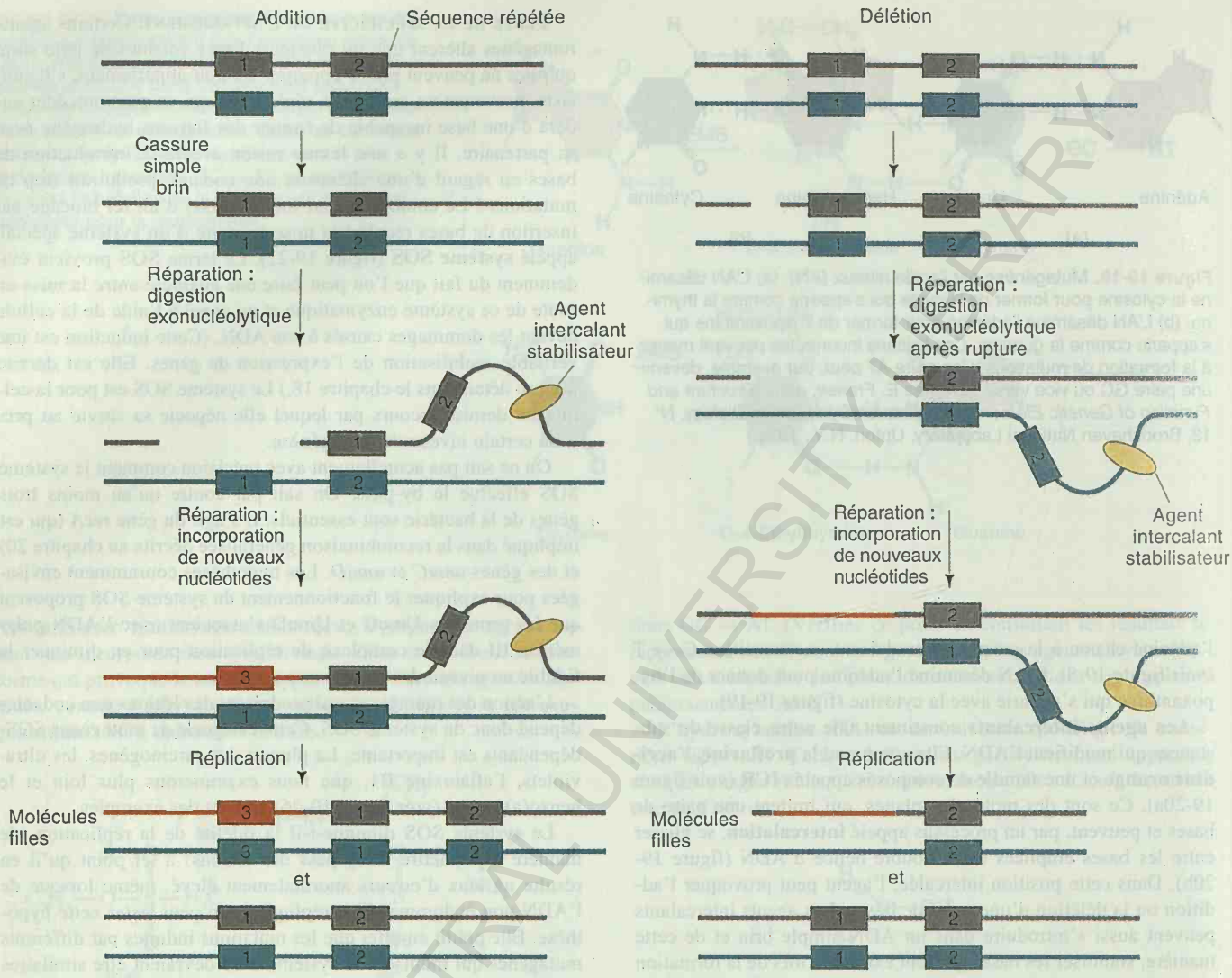


Figure 19-21. Mode d'action des agents intercalants. Nous supposons ici que le mutagène agit uniquement au cours d'une modification de l'ADN (recombinaison ou réparation), en s'intercalant dans une boucle simple brin et en la stabilisant. (Voir aussi les figures 19-4 et 19-20). Pour qu'une addition se produise, la boucle doit pouvoir être stabilisée par la présence d'une courte séquence répétée.

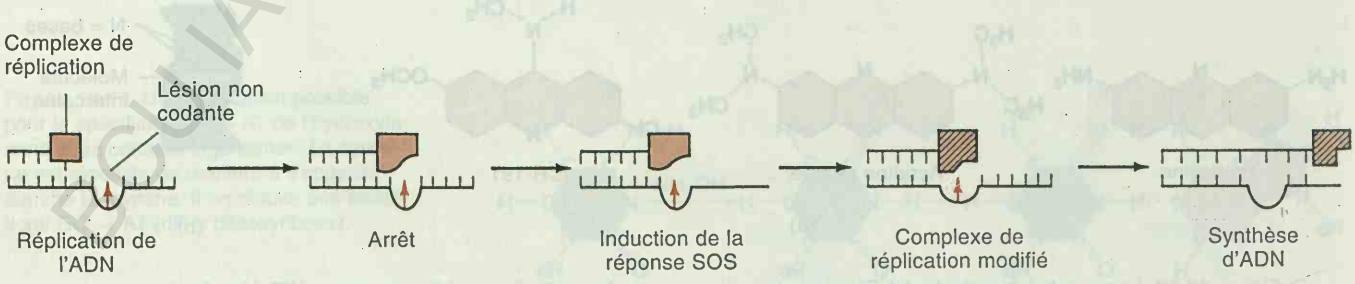


Figure 19-22. Le système SOS permet le franchissement de lésions non codantes. Le dessin, très schématique, montre l'arrêt de la réplication de l'ADN en réponse à une lésion non codante. Le système SOS élimine le blocage, en modifiant le complexe de réplication.

EQUIASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

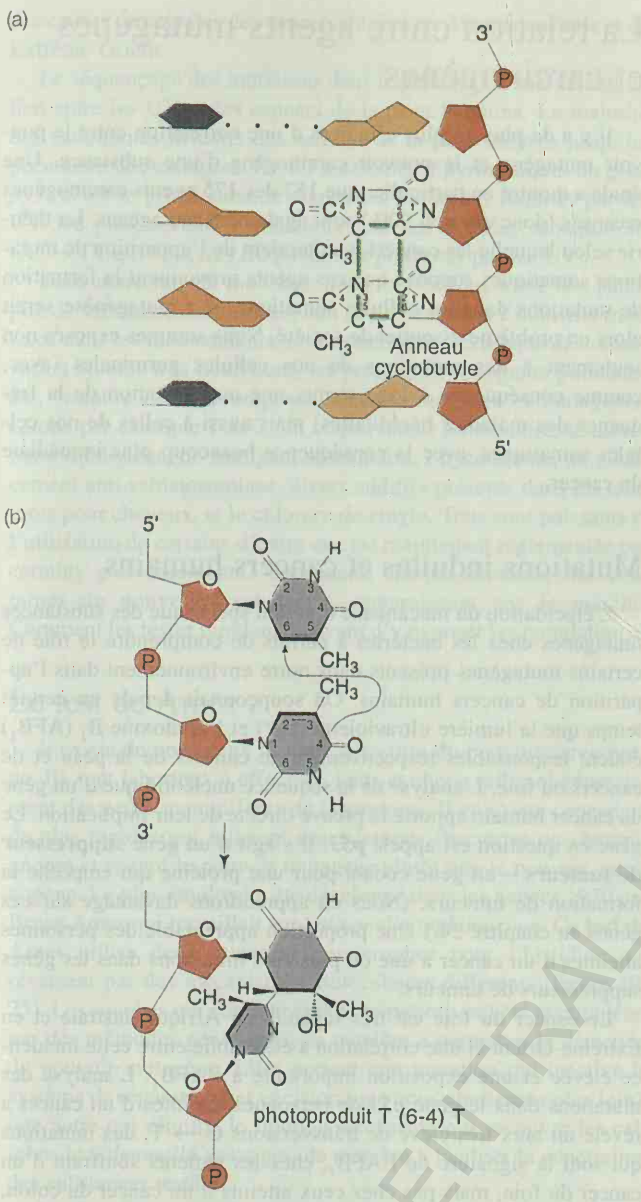


Figure 19-23. (a) Structure d'un dimère pyrimidine cyclobutane. La lumière UV stimule la formation d'un anneau cyclobutyle (en vert) entre deux pyrimidines adjacentes, en agissant sur les doubles liaisons 5,6. (b) Structure du photoproduit 6-4. Ce produit se forme surtout à partir de 5'-C-C-3' et 5'-T-C-3', par réaction entre les positions C-6 et C-4 de deux pyrimidines adjacentes. La structure locale de la double hélice est sérieusement perturbée. (La partie (a) est adaptée de E.C. Friedberg, *DNA Repair*, Copyright © 1985 chez W.H. Freeman. Partie (b) adaptée de J.S. Taylor et al.)

d'induire le système SOS. L'étude de la spécificité mutationnelle montre cependant que ce n'est pas le cas. Différents mutagènes qui induisent le système SOS ont des spécificités différentes. Cela se voit très bien en comparant la spécificité des UV à celle de l'AFB_1 sur la figure 19-13. Chaque agent présente une spécificité du type de mutation induite par le système SOS. Donc les mutations doivent être générées en réponse à une lésion spécifique de l'ADN. Il existe une grande variété de lésions dont les plus étudiées sont les photodérivés induits par les UV, les sites apuriniques et les adduits volumineux sur des bases spécifiques.

La **lumière ultraviolette** (UV) stimule la formation d'une série de photoproduits sur la chaîne d'ADN. Deux espèces de lésions qui, toutes deux, se produisent sur des pyrimidines adjacentes, sont importantes dans le processus de la mutagénèse UV. Le photodimère cyclobutane-pyrimidine et le photoproduit 6-4 (figure 19-23) interfèrent avec l'appariement normal des bases. Ces lésions induisent le système SOS. L'insertion d'une base en face du photoproduit provoque, le plus souvent, une transition mais la lumière UV peut aussi stimuler la formation de transversions, de mutations de phase, de délétions et de duplications. La figure 19-13 illustre la spécificité mutationnelle des UV.

L'**aflatoxine B_1** (AFB_1) est un puissant carcinogène. Elle provoque l'apparition de sites apuriniques suite à la formation d'un produit de substitution en position N-7 de la guanine (figure 19-24). Des études utilisant des sites apuriniques formés in vitro ont montré que le bypass de ces lésions nécessite le système SOS et mène à l'insertion préférentielle d'une adénine en face des sites apuriniques. On peut donc s'attendre à ce que des agents qui provoquent la dépurination au niveau de résidus guanine induisent préférentiellement des transversions GC → TA. Voyez-vous pourquoi il en est ainsi ? La figure 19-13, qui montre aussi l'analyse génétique d'une série de mutations induites par l'AFB_1, révèle qu'elles sont en majorité des transversions GC → TA.

L'AFB_1 fait partie d'une catégorie de carcinogènes qui se fixent de façon covalente à l'ADN. Le benzo(a)pyrène, produit par les moteurs à combustion, est un autre exemple de telles substances. Pour nombre de substances, la nature exacte de l'addition faite à l'ADN et responsable de l'effet mutagène n'est pas connue. Dans certains cas, la spécificité mutationnelle suggère que la dépurination pourrait effectivement être une étape intermédiaire de la muta-

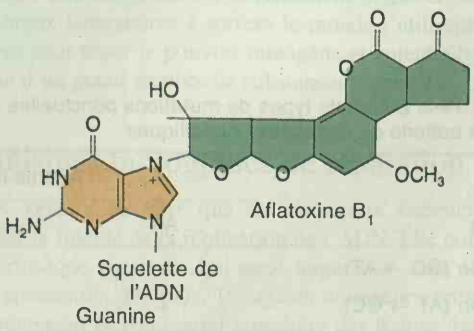


Figure 19-24. Liaison à l'ADN de l'aflatoxine B_1 activée par voie métabolique.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY
B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI BIOLOGIE

génèse ; dans d'autres cas, par contre, on ne sait encore rien du mécanisme qui opère.

Message Les mutagènes induisent les mutations par différents mécanismes. Certains mutagènes sont des analogues des bases normales et ils sont incorporés dans l'ADN où ils peuvent provoquer des appariements incorrects. D'autres réagissent avec les bases et provoquent des appariements incorrects ou encore empêchent l'appariement. Dans ce dernier cas, l'induction d'un système enzymatique de contournement (bypass), appelé système SOS, est requise pour permettre à la réplication de franchir l'obstacle constitué par les lésions.

Analyse par réversion

Nous avons vu que les mécanismes de mutagénèse sont souvent très spécifiques. L'analyse par réversion peut nous apporter des informations sur la nature des mutations et sur l'action des mutagènes. Si par exemple une mutation ne peut pas réverser sous l'effet du mutagène qui l'a induite, cela veut dire que le mutagène en question a une action unidirectionnelle relativement spécifique. Prenons par exemple l'hydroxylamine (HA) qui induit des transitions GC → AT. Elles ne peuvent évidemment pas réverser par un second événement du même type. Une mutation qui réverse sous l'effet de la proflavine a toutes les chances d'être une mutation de phase. Une mutation induite par l'acide nitreux (AN) qui provoque des transitions ne réversera pas sous l'effet de la proflavine.

Les transversions sont difficiles à détecter par réversion mais suite à des analyses de séquence d'ADN et de protéines, on sait qu'elles sont fréquentes parmi les mutations spontanées. Dans les tests de réversion, on considérera donc, par élimination, que les mutations qui réversent spontanément mais qui ne réversent ni sous l'effet d'agents qui provoquent des transitions ni sous l'effet d'agents qui induisent des mutations de phase, sont des transversions. Notons que la logique du test de réversion repose sur la supposition que ce ne sont ni des suppresseurs, ni des éléments transposables qui provoquent la réversion. S'il en était autrement, il serait beaucoup plus difficile de tirer des conclusions des tests de réversion.

Le tableau 19-3 résume ce que l'on peut attendre de ce type de tests en faisant des hypothèses simples. Il faut cependant se rappeler que la spécificité des mutagènes dépend de l'organisme considéré, de son génotype, du gène étudié et de la plus ou moins grande efficacité des systèmes biologiques de réparation.

La relation entre agents mutagènes et carcinogènes

Il y a de plus en plus d'indices d'une corrélation entre le pouvoir mutagène et le pouvoir carcinogène d'une substance. Une étude a montré en particulier que 157 des 175 agents carcinogènes recensés (donc environ 90%) sont également mutagènes. La théorie selon laquelle les cancers résulteraient de l'apparition de mutations somatiques suppose que ces agents provoquent la formation de mutations dans les cellules somatiques. La mutagénèse serait alors un problème essentiel de société. Nous sommes exposés non seulement à des mutations de nos cellules germinales (avec, comme conséquence à long terme, une augmentation de la fréquence des maladies héréditaires) mais aussi à celles de nos cellules somatiques, avec la conséquence beaucoup plus immédiate du cancer.

Mutations induites et cancers humains

L'élucidation du mécanisme d'action spécifique des substances mutagènes chez les bactéries a permis de comprendre le rôle de certains mutagènes présents dans notre environnement dans l'apparition de cancers humains. On soupçonnait depuis un certain temps que la lumière ultraviolette (UV) et l'aflatoxine B_1 (AFB_1) étaient responsables respectivement de cancers de la peau et de cancers du foie. L'analyse de la séquence nucléotidique d'un gène du cancer humain apporte la preuve directe de leur implication. Le gène en question est appelé ***p53***. Il s'agit d'un gène **suppresseur de tumeurs** – un gène codant pour une protéine qui empêche la formation de tumeurs. (Nous en apprendrons davantage sur ces gènes au chapitre 24.) Une proportion appréciable des personnes atteintes d'un cancer a une ou plusieurs mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs.

Le cancer du foie est très répandu en Afrique australe et en Extrême-Orient et une corrélation a été établie entre cette incidence élevée et une exposition importante à l'AFB_1. L'analyse des mutations dans le gène *p53* de personnes atteintes d'un cancer a révélé un taux très élevé de transversions G → T, des mutations qui sont la signature de l'AFB_1, chez les patients souffrant d'un cancer du foie, mais pas chez ceux atteints d'un cancer du colon, du poumon ou du sein. Par contre, les mutations du gène *p53* chez les patients habitant des régions où l'exposition à l'AFB_1 est minime n'étaient en général pas des transversions G → T. Ces résultats, combinés à ceux des tests de spécificité mutagénique de l'AFB_1 (figure 19-13), permettent de conclure que l'AFB_1 est une

Tableau 19-3. Différents types de mutations ponctuelles qui peuvent, en principe, être reconnues par leur profil de réversion en réponse à une batterie de mutagènes spécifiques

	Agents mutagènes et profil de réversion			
Mutation	AN	HA ou EMS	Proflavine	Spontanées
Transition (GC → AT)	+	–	–	+
Transition (AT → GC)	+	+	–	+
Transversion	–	–	–	+
Mutation de phase	–	–	+	+

NOTE : + indique une fréquence de réversion mesurable sous l'effet du mutagène. AN = acide nitreux ; HA = hydroxylamine ; EMS = éthyl méthane sulfonate.

des causes principales des cancers du foie en Afrique australe et en Extrême-Orient.

Le séquençage des mutations dans le gène *p53* a aussi établi un lien entre les UV et les cancers de la peau humains. La majorité des carcinomes invasifs des cellules de la peau anlysés jusqu'ici présentent des mutations C → T à des sites dipyrimidiques du gène *p53*. C'est le profil caractéristique des mutations induites par les UV. De plus, certaines mutations sont des doubles substitutions CC → TT qui sont très fréquemment produites par les UV.

Dans notre monde moderne, nous rencontrons toute une panoplie de substances chimiques, non seulement dans l'industrie mais aussi dans les médicaments, les cosmétiques, les agents de conservation ajoutés à la nourriture, les pesticides, les agents polluants, etc. Nombre de ces composés sont carcinogènes et mutagènes. Citons par exemple l'AF2, un conservateur alimentaire, le dibromure d'éthylène, un fumigant alimentaire, l'hycanthone, un médicament anti-schistosomiase, divers additifs présents dans les teintures pour cheveux, et le chlorure de vinyle. Tous sont puissants et l'utilisation de certains d'entre eux est maintenant réglementée par certains gouvernements. Cependant, chaque semaine, des centaines de nouvelles substances apparaissent sur le marché. Comment les tester rapidement avant d'y exposer les populations ?

Le test de Ames

Il existe de nombreux tests de détection du pouvoir carcinogène. Ils sont laborieux à effectuer, lents et chers, utilisant généralement des petits mammifères de laboratoire. Il en existe cependant de plus rapides qui utilisent des microbes (bactéries ou champignons) et testent le pouvoir mutagène plutôt que le pouvoir carcinogène. Le plus employé a été développé dans les années 1970 par Bruce Ames qui travaillait sur *Salmonella typhimurium*. Ce **test de Ames** utilise deux mutations auxotrophes pour l'histidine qui réversent par des mécanismes moléculaires différents (figure 19-25). Les souches qui contiennent ces mutations ont été manipulées, par des méthodes génétiques, de manière à permettre la détection du pouvoir mutagène. Elles portent une mutation qui inactive le système de réparation par excision (que nous étudierons plus loin), une autre qui élimine le lipopolysaccharide qui recouvre les cellules de *Salmonella* sauvages, de manière à faciliter la pénétration des substances testées.

Les bactéries sont, du point de vue évolutif, extrêmement éloignées de l'homme. On peut donc se demander si un test réalisé sur des bactéries a réellement un sens lorsqu'il s'agit de tester le pouvoir carcinogène d'une substance. Nous avons vu que la nature chimique de l'ADN est la même chez tous les organismes. Il est donc vraisemblable qu'une substance mutagène pour un organisme le soit aussi dans une certaine mesure pour les autres. De plus, Ames a mis au point une manière de simuler le métabolisme humain dans le système bactérien. Les substances chimiques absorbées par les mammifères sont en grande partie métabolisées dans le foie où elles sont détoxifiées et dégradées. Il arrive que sous l'action d'enzymes hépatiques, une substance inoffensive soit transformée en un dérivé mutagène (figure 19-26). Ames incorpora donc des enzymes hépatiques de mammifères dans son système bactérien. Ce sont des foies de rat qui sont généralement utilisés à cette fin. Le protocole expérimental du test de Ames est résumé sur la figure 19-27.

Le test de Ames a permis de détecter un grand nombre de substances carcinogènes parmi des composés chimiques très divers. Ces substances peuvent être considérées non seulement comme des carcinogènes potentiels (source de mutations somatiques) mais aussi comme des causes possibles de mutations dans les cellules germinales. Comme ce test est extrêmement simple et bon marché, de nombreux laboratoires à travers le monde l'utilisent de façon routinière pour tester le pouvoir mutagène et potentiellement carcinogène d'un grand nombre de substances suspectes.

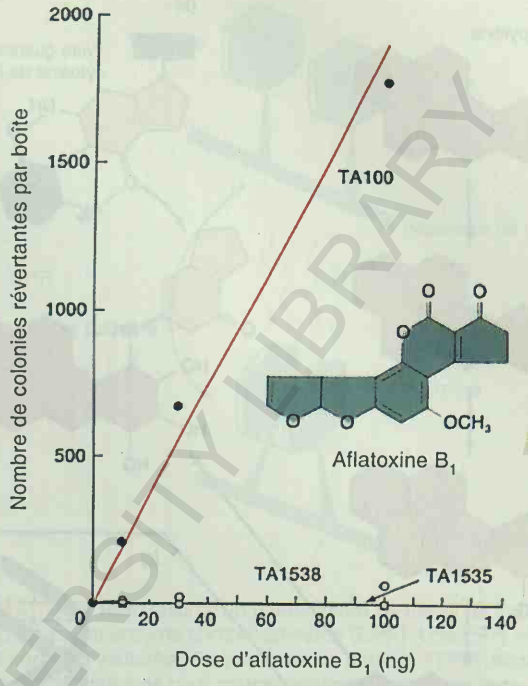


Figure 19-25. Pouvoir mutagène de l'aflatoxine B_1 (en outre un puissant carcinogène) montré par le test de Ames. TA100, TA1538 et TA1535 sont des souches de *Salmonella typhimurium* qui portent différentes mutations auxotrophes *his*. TA100 est un mutant *his* très sensible à la réversion par les agents qui induisent des substitutions de bases. TA1538 et TA1535 sont des mutants *his* sensibles à la réversion par des agents inducteurs de mutations de phase. Les résultats du test montrent que l'aflatoxine B_1 est un mutagène puissant qui induit des substitutions, mais pas des décalages du cadre de lecture. (D'après J. McCann et B.M. Ames, dans *Advances in Modern Toxicology*, Vol.5. édité par W.G. Flamm et M.A. Mehlman. Copyright© par Hemisphere Publishing Corp., Washington, D.C.).

Mécanismes biologiques de réparation

Nous venons de voir que de nombreux facteurs peuvent influencer la fidélité de la réplication de l'ADN. Elle comporte un taux intrinsèque d'erreurs qui peut augmenter sous l'effet des lésions spontanées. De plus, les agents mutagènes présents dans l'environnement peuvent aussi introduire des lésions dans l'ADN et par là, augmenter le taux d'apparition de mutations.

Les cellules vivantes ont développé des systèmes enzymatiques qui réparent les lésions de l'ADN de différentes façons. La déficience d'un de ces systèmes peut augmenter le taux global de

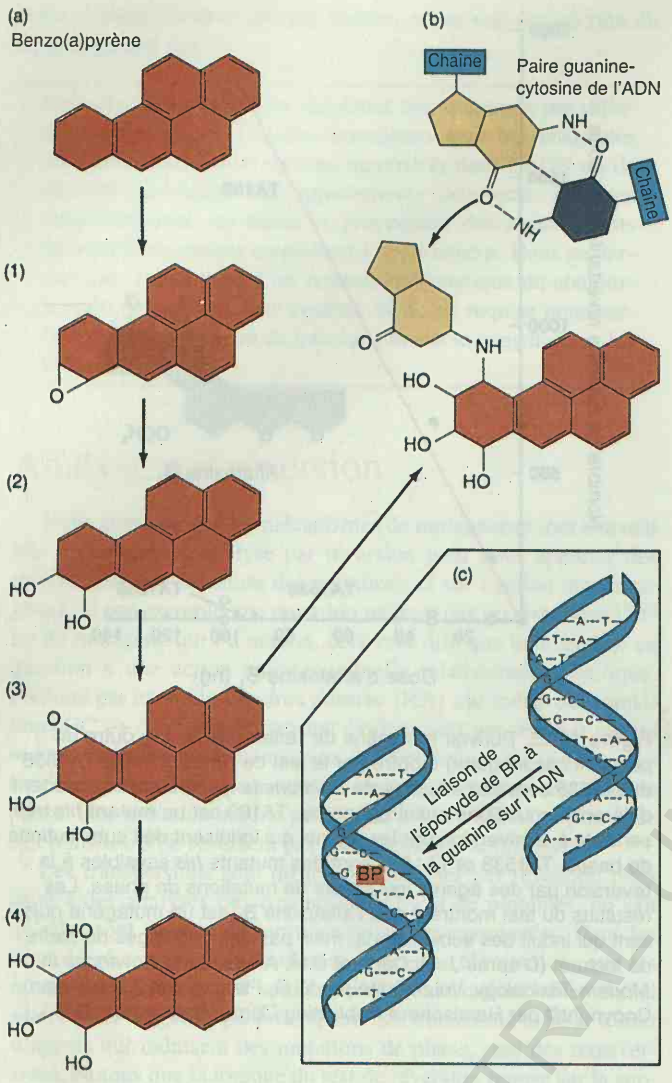


Figure 19-26. Conversion métabolique du benzo(a)pyrène (BP) en un mutagène (et carcinogène). La conversion du BP se fait en plusieurs étapes qui le rendent de plus en plus soluble dans l'eau avant qu'il soit excrété. L'un des intermédiaires de ce processus, un diol époxyde (3), peut réagir avec la guanine de l'ADN. Ceci provoque une distorsion de la molécule d'ADN (c) et des mutations. Le BP est de ce fait un mutagène pour toutes les cellules qui peuvent produire cet intermédiaire. (D'après I.B. Weinstein et al., *Science* 193, 1976, 592-595 ; Dans J. Cairns, *Cancer : Science and Society.* Copyright© 1978 par H. Freeman and Company.)

mutation. Nous verrons plus loin que plusieurs maladies humaines sont provoquées par des déficiences des systèmes de réparation de l'ADN. Passons d'abord en revue les systèmes de réparation connus. Nous verrons ensuite comment, au niveau cellulaire, ils sont intégrés dans une stratégie globale de réparation.

Nous pouvons distinguer plusieurs catégories de voies de réparation.

La prévention des erreurs

Certains de ces systèmes inactivent le composant potentiellement toxique avant même qu'il ait pu interagir avec l'ADN. C'est le cas de la **superoxyde dismutase,** une enzyme **détoxifiante** qui catalyse la conversion de radicaux super-oxyde (produits par l'action d'agents oxydants sur l'ADN) en peroxyde d'hydrogène. La **catalase**, une autre enzyme, convertit ensuite le peroxyde en eau.

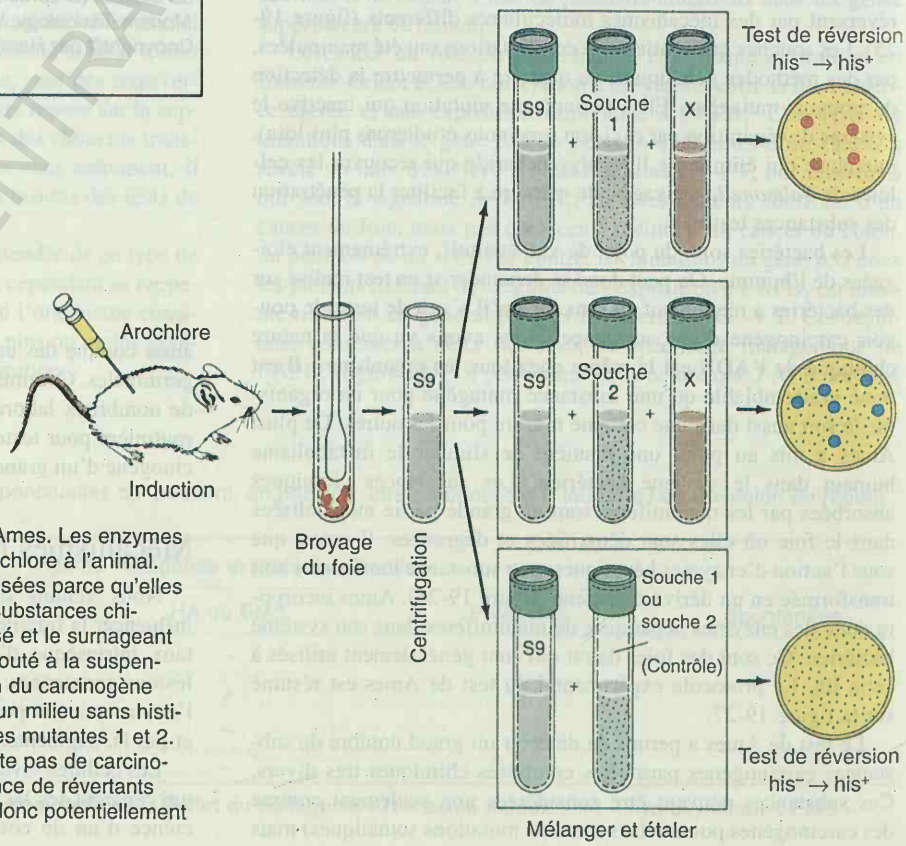


Figure 19-27. Résumé du protocole du test de Ames. Les enzymes de foie de rat sont mobilisées par injection d'Arochlore à l'animal. (Ce sont les enzymes du foie de rat qui sont utilisées parce qu'elles effectuent la détoxification et la toxification des substances chimiques du corps.) Le foie de rat est homogénéisé et le surnageant qui contient les enzymes solubilisées (S9) est ajouté à la suspension de bactéries auxotrophes dans une solution du carcinogène potentiel à tester (X). Ce mélange est étalé sur un milieu sans histidine et l'on recherche des révertants des souches mutantes 1 et 2. Une expérience contrôle dans laquelle on n'ajoute pas de carcinogène est toujours menée en parallèle. La présence de révertants indique que la substance testée est mutagène, donc potentiellement carcinogène.

UNIASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Un autre système préventif utilise une enzyme codée par le gène *mut T*, qui empêche l'incorporation de 8–oxodG (figure 19-10) dans l'ADN en hydrolysant le triphosphate de la 8–oxodG en monophosphate.

La réversion directe

La manière la plus simple de réparer une lésion est évidemment de l'exciser au plus vite, de manière à régénérer la base normale. Cependant, l'excision directe n'est pas toujours possible ; certains types de dégâts sont irréversibles. Un exemple d'excision directe se rencontre dans le cas des lésions causées par les UV. Nous avons vu qu'ils provoquent la formation de photoproduits dont certains font intervenir des pyrimidines adjacentes sur le même brin d'ADN. Ces photodimères sont essentiellement de deux types (figure 19-23). La cyclobutane-pyrimidine peut être réparée par une **enzyme de photoréactivation (EPR)**, alors que le produit en 6-4 ne le peut pas. L'EPR opère, en présence d'une lumière visible de longueur d'onde appropriée, en se fixant sur le photoproduit et en l'excisant pour régénérer la base de départ (figure 19-28). Comme cette enzyme n'opère pas dans l'obscurité, d'autres sont nécessaires pour réparer les lésions dues aux UV. Une photolyase qui répare les photoproduits en 6-4 a été identifiée chez les plantes et chez *Drosophila*.

Les **alkyltransférases** sont des enzymes qui éliminent directement certaines lésions comme les groupes alkyles, ajoutés par des agents tels que l'EMS ou la NG en position O-6 des résidus guanine (figure 19-17). La méthyltransférase d'*E. coli* est bien connue. Elle transfère le groupe méthyle de la O-6-guanine à un résidu cystéine de la protéine (figure 19-29). Lorsque cette réaction se produit, l'enzyme est inactivée. Ce système de réparation peut donc être saturé lorsque le niveau d'alkylation est trop élevé. Le contrôle de l'expression du gène de l'alkyltransférase est discuté page 610.

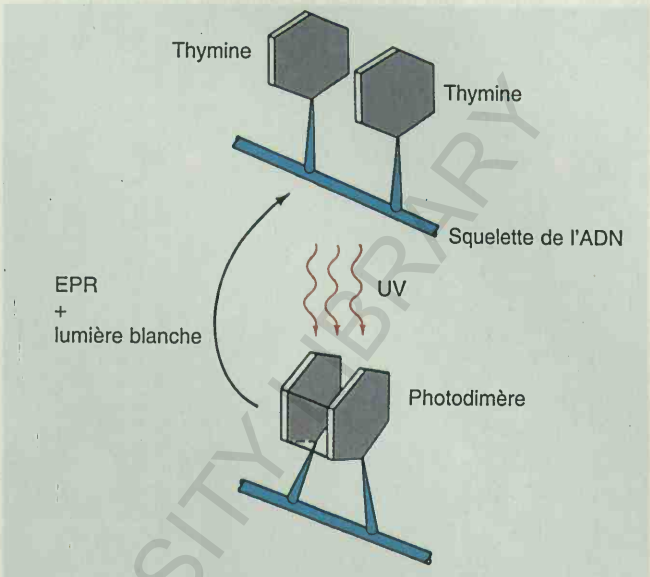


Figure 19-28. Réparation d'un photodimère de thymines induit par les UV par une enzyme photoréactivante (EPR). Une EPR reconnaît le dimère et s'y attache. En présence de lumière, l'EPR utilise l'énergie des photons pour couper le dimère en monomères. (D'après J.D.Watson, *Molecular Biology of the Gene*, 3ème éd. Copyright © 1976 par W.A.Benjamin.)

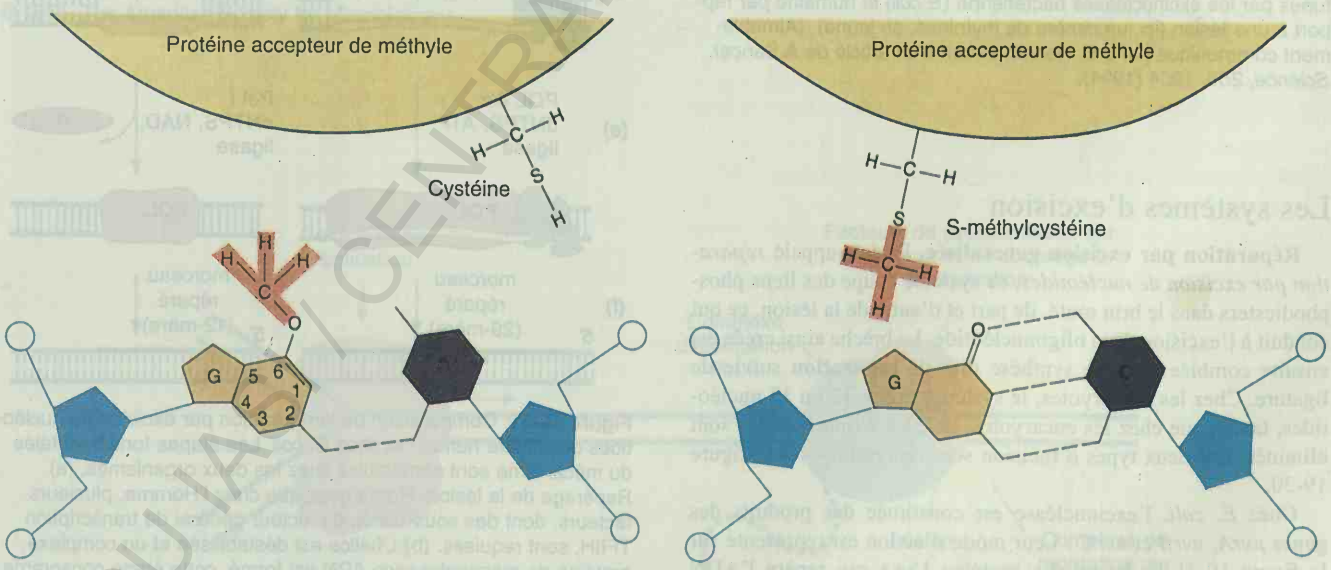


Figure 19-29. La méthylation de la guanine par la nitrosoguanidine (NG) est réparée directement par une alkyltransférase. La NG méthyle l'ADN en divers endroits, entre autres au niveau de l'oxygène en position 6 de la guanine (à gauche). Ceci entraîne la rupture de la liaison hydrogène entre la guanine et la cytosine. La réparation est effectuée par une enzyme - une alkyltransférase - que la cellule synthétise pendant une période d'adaptation qui suit l'exposition à de faibles doses de NG. C'est une cystéine (l'un des 20 acides aminés) de la protéine qui sert d'accepteur pour le groupe méthyle ce qui restaure la guanine (à droite). (D'après P. Howard-Flanders, «Inducible repair of DNA», Copyright ©1981 par Scientific American, Inc. Tous Droits Réservés.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

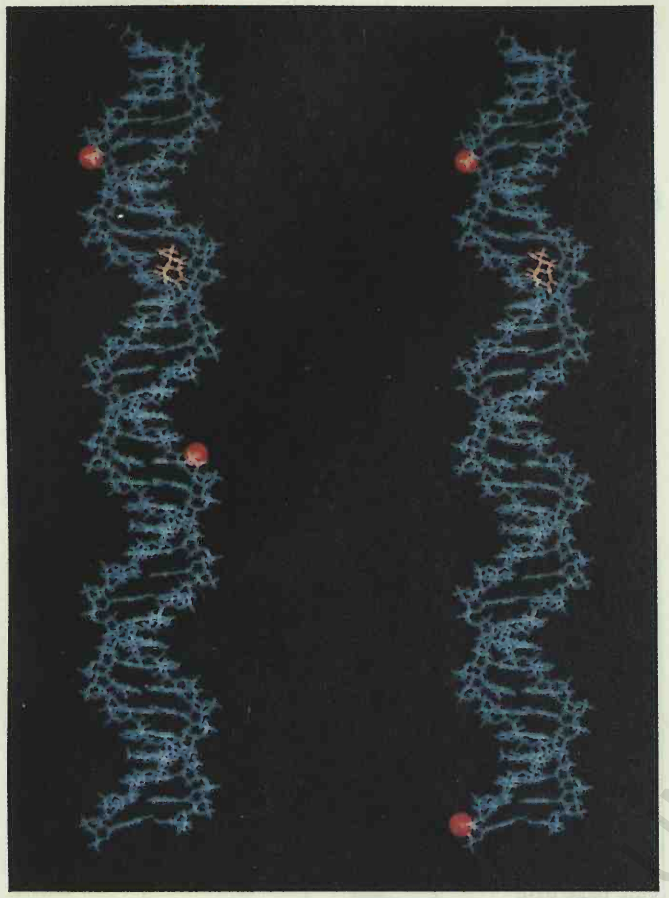


Figure 19-30. Positionnement (points rouges) des incisions effectuées par les excinucléases bactérienne (*E.coli*) et humaine par rapport à une lésion (ici, un dimère de thymines, en jaune). (Aimablement communiqué par J.E. Hearst, extrait d'un article de A.Sancar, *Science*, 266, 1954 (1994).

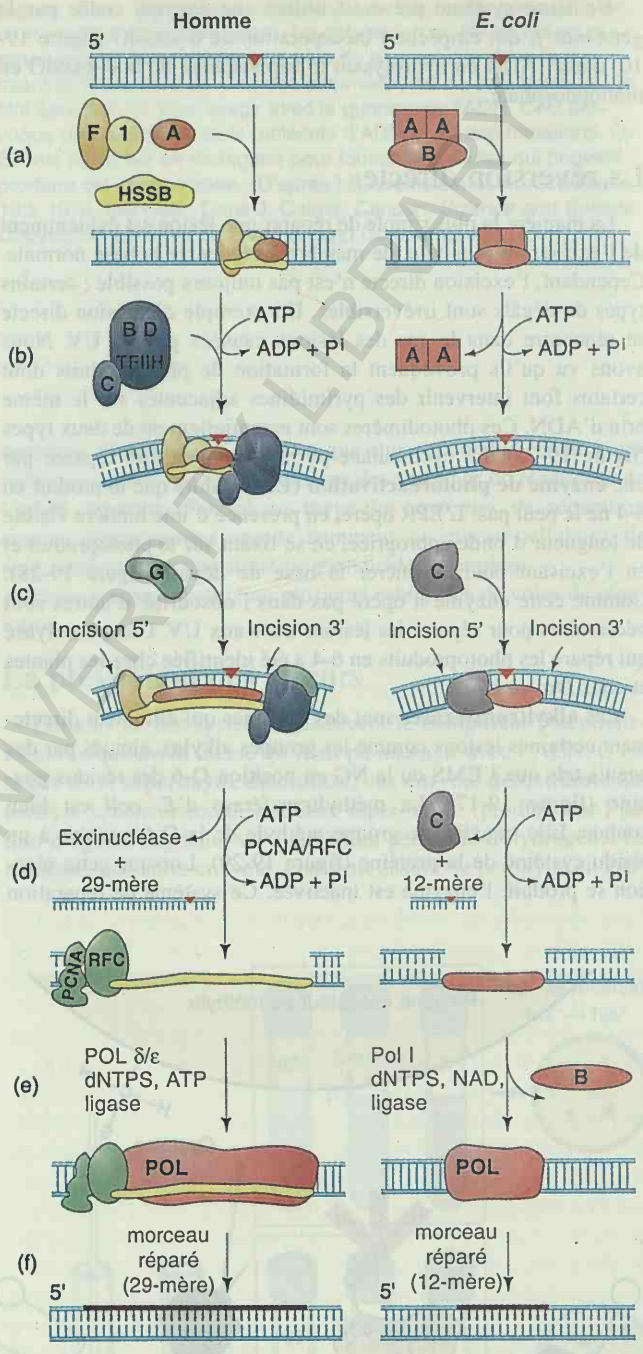


Figure 19-31. Comparaison de la réparation par excision de nucléotides chez l'être humain et chez *E. coli*. Les étapes fondamentales du mécanisme sont semblables chez les deux organismes. (a) Repérage de la lésion. Remarquez que chez l'Homme, plusieurs facteurs, dont des sous-unités du facteur général de transcription TFIIH, sont requises. (b) L'hélice est déstabilisée et un complexe protéine de reconnaissance-ADN est formé. cette étape consomme de l'ATP. (c) Une nucléase se fixe et pratique deux incisions. (d) Le segment excisé et l'excinucléase sont libérés. Cette étape est assistée par une ADN hélicase, Hel II chez *E. coli*, PCNA (antigène nucléaire des cellules proliférantes) et la protéine de réplication RFC chez l'Homme. (e) Les protéines de synthèse de réparation se fixent. (f) La brèche est réparée par remplissage suivi de ligature. (Adapté de A. Sancar, *Science*, 266, 1955 (1994).

Les systèmes d'excision

Réparation par excision generalisée. Parfois appelé *réparation par excision de nucléotides*, ce système coupe des liens phosphodiesters dans le brin muté, de part et d'autre de la lésion, ce qui conduit à l'excision d'un oligonucléotide. La brèche ainsi créée est ensuite comblée par une synthèse dite **de réparation** suivie de ligature. Chez les procaryotes, le système excise 12 ou 13 nucléotides, tandis que chez les eucaryotes, de 27 à 29 nucléotides sont éliminés. Les deux types d'incision sont représentés sur la figure 19-30.

Chez *E. coli*, l'excinucléase est constituée des produits des gènes *uvrA*, *uvrB* et *uvrC* . Leur mode d'action est représenté sur la figure 19-31 (à droite). La protéine UvrA qui repère l'ADN endommagé, forme un complexe avec UvrB (figure 19-31a) et la positionne au site de la lésion avant de s'en dissocier (figure 19-31b). La protéine UvrC se fixe alors sur UvrB et chacune de ces sous-unités effectue une incision (figure 19-31c). L'oligonucléotide dodécamérique est désenroulé et libéré sous l'action d'une autre protéine, l'hélicase II (figure 19-31d). Une synthèse de réparation est effectuée par l'ADN-polymérase I et la ligase (figure 19-31e et f). La figure 19-32 décrit plus en détail le mécanisme d'excision.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

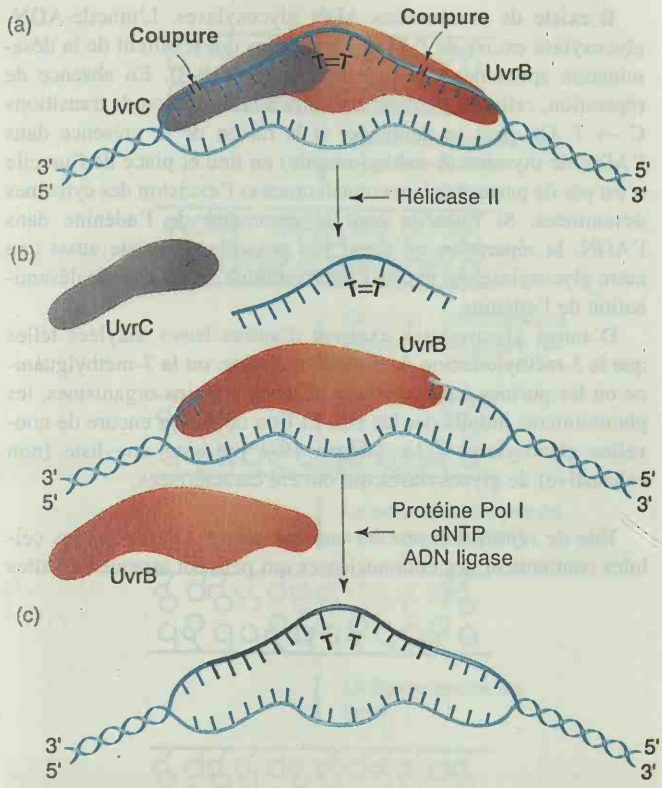


Figure 19-32. Vue schématique des événements qui suivent l'incision par l'excinucléase Uvr ABC chez *E. coli*. L'ADN hélicase II facilite le largage du segment d'ADN monocaténaire contenant la lésion. La protéine Uvr C est aussi détachée à ce stade. La synthèse de réparation qui suit déplace Uvr B. (Extrait de E.C. Friedberg, G.C. Walker et W. Seide, *DNA Repair and Mutagenesis*. Copyright © 1955. The American Society for Microbiology.)

L'excinucléase humaine est beaucoup plus complexe que son équivalent bactérien et fait intervenir au moins 17 protéines (figure 19-31, à gauche). Toutefois le mécanisme de base est le même que chez *E. coli*. Parmi les protéines identifiées, citons XPA, XPB, XPC, XPD, XPF, XPG et ERCC1 ainsi que le facteur de réplication HSSB. XPB et XPD (représentées par B et D sur la figure) sont deux des huit sous-unités du facteur général de transcription TFIIH. XPA repère la lésion et guide TFIIH vers le site endommagé. TFIIH déroule ensuite la double hélice, ce qui permet aux excinucléases XPG et XPF d'opérer (figure 19-31).

Couplage de la transcription et de la réparation. La participation du facteur de transcription TFIIH dans la réparation par excision montre l'existence d'un couplage entre la transcription et la réparation. Tant chez les eucaryotes que chez les procaryotes, le brin transcrit des gènes en cours d'expression est réparé préférentiellement. La figure 19-33 présente un mécanisme possible pour ce couplage.

Voies d'excision spécifiques. Certaines lésions ne causent pas de distorsions détectables par le système général d'excision *uvrA,B,C* ou par son équivalent chez les organismes supérieurs. D'autres systèmes d'excision sont donc nécessaires.

Réparation par les ADN glycosylases (Réparation par excision des bases). Les **ADN glycosylases** ne clivent pas les liens phosphodiesters de l'ADN mais les liens *N*-glycosidiques (entre le sucre et la base). Il s'ensuit l'excision de la base endommagée et la formation d'un site apurinique ou apyrimidique (AP) (figure 19-34). La voie décrite dans la section suivante (figure 19-35) répare alors les sites AP.

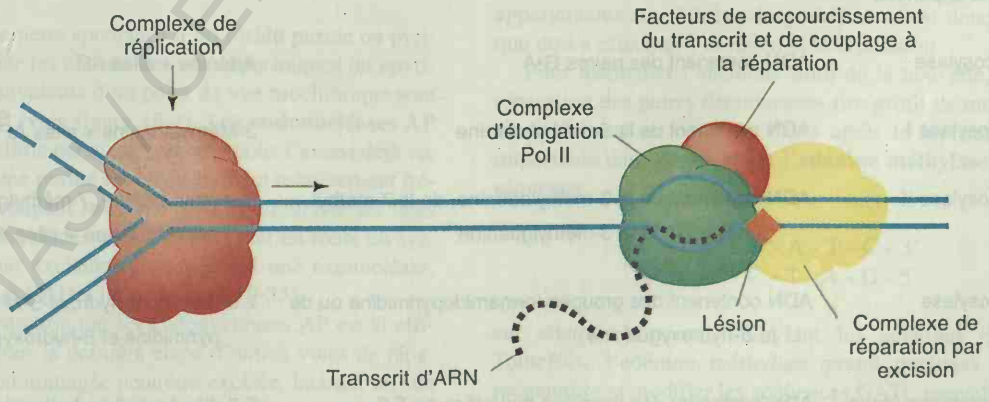


Figure 19-33. La réparation par excision de nucléotides est couplée à la transcription. Ce modèle du mécanisme de couplage dans une cellule de mammifère montre la polymérase (en vert) arrêtée par une lésion. Elle subit un changement de conformation, ce qui permet l'initiation d'un raccourcissement du transcrit naissant (la polymérase «recule») et la réassociation des brins au site endommagé. Les facteurs protéiques impliqués dans le couplage mobilisent TFIIH et les autres éléments nécessaires aux réactions d'incision, d'excision et de resynthèse. Une fois terminée la réparation, la transcription peut continuer. (Extrait de P.C. Hanawalt, *Science*, 266, 1957, 1994.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

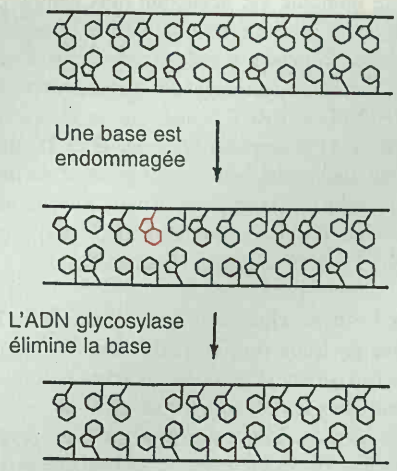


Figure 19-34. Action des ADN glycosylases. Les glycosylases éliminent les bases abîmées et créent un site AP. Le site AP est ensuite excisé par les AP endonucléases décrites dans la figure 19-31. (D'après B. Lewin, *Genes*, Copyright© 1983 par J. Wiley.)

Il existe de nombreuses ADN glycosylases. L'uracile-ADN-glycosylase excise de l'ADN les uraciles qui résultent de la désamination spontanée des cytosines (figure 19-8). En absence de réparation, celles-ci peuvent conduire à la formation de transitions C → T. On peut se demander si la raison de la présence dans l'ADN de thymine (5-méthyl-uracile) en lieu et place de l'uracile n'est pas de permettre la reconnaissance et l'excision des cytosines désaminées. Si l'uracile était la partenaire de l'adénine dans l'ADN, la réparation ne serait pas possible. Il existe aussi une autre glycosylase qui excise l'hypoxanthine, le produit de désamination de l'adénine.

D'autres glycosylases excisent d'autres bases alkylées telles que la 3-méthyladénine, la 3-méthylguanine, ou la 7-méthylguanine ou les purines à cycle ouvert et, chez certains organismes, les photodimères induits par les UV. Et l'on découvre encore de nouvelles glycosylases ! Le tableau 19-4 présente une liste (non exhaustive) de glycosylases qui ont été caractérisées.

Voie de réparation par les endonucléases AP. Toutes les cellules contiennent des endonucléases qui peuvent attaquer les sites

Tableau 19-4. ADN glycosylases.

Enzyme	Substrat	Produits
Ura-ADN glycosylase	ADN contenant de l'uracile	Uracile + sites AP
Hmu-ADN glycosylase	ADN contenant de l'hydroxyméthyluracile	Hydroxyméthyluracile + sites AP
5-mC-ADN glycosylase	ADN contenant de la 5-méthylcytosine	5-méthylcytosine + sites AP
Hx-ADN glycosylase	ADN contenant de l'hypoxanthine	Hypoxanthine + sites AP
ADN glycosylase des thymines mal appariées	ADN contenant des paires G•T	Thymine + sites AP
Mut Y-ADN glycosylase	ADN contenant des paires G•A	Adénine + sites AP
3-mA-ADN glycosylase I	ADN contenant de la 3-méthyladénine	3-Méthyladénine + sites AP
3-mA-ADN glycosylase II	ADN contenant de la 3-méthyladénine, de la 7-méthylguanine ou de la 3-méthylguanine	3-méthyladénine, 7-méthylguanine ou 3-méthylguanine + sites AP
FaPy-ADN glycosylase	ADN contenant des groupes formamidopyrimidine ou de la 8-hydroxyguanine	2.6-diamino-4-hydroxy-5-*N*-méthylformamido-pyrimidine et 8-hydroxyguanine + sites AP
5,6-HT-ADN glycosylase (endonucléase III)	ADN contenant des thymines hydratées en 5,6	5,6-dihydroxydi-hydrothymine ou 5,6-dihydrothymine + sites AP
PD-ADN glycosylase	ADN contenant des dimères de pyrimidines	Dimères de pyrimidines dans l'ADN, avec les liaisons glycosyl 5' hydrolysées, + sites AP

SOURCE : E.C. Friedberg, G.C. Walker et W. Siede, *DNA Repair and Mutagenesis.* ASM Press, Washington DC.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

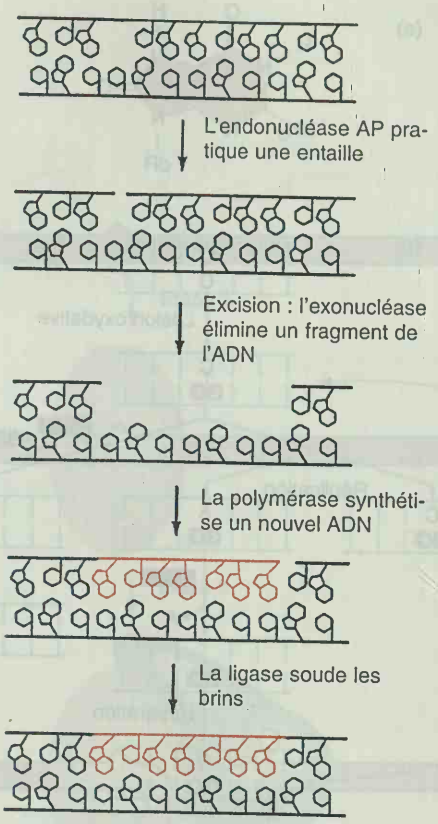


Figure 19-35. Réparation de sites AP. L'endonucléase AP reconnaît les sites AP et coupe le lien phosphodiester correspondant. Une exonucléase élimine un segment d'ADN et la brèche qui en résulte est comblée par l'ADN polymérase I et l'ADN ligase. (D'après B. Lewin, *Genes*. Copyright© 1983 par J. Wiley.)

formés à la suite de la perte spontanée d'un résidu purine ou pyrimidine. Pour simplifier les choses, ces sites apuriniques ou apyrimidiques qui sont équivalents d'un point de vue biochimique sont tous appelés **sites AP** (voir figure 19-7). Les **endonucléases AP** sont vitales pour la cellule parce que, comme nous l'avons déjà vu, la perte spontanée d'une purine est un événement relativement fréquent. Ces enzymes coupent la chaîne d'ADN en clivant les liens phosphodiesters au niveau des sites AP. Ceci met en route un système de réparation par excision qui comprend une exonucléase, l'ADN polymérase I et l'ADN ligase (figure 19-35).

Le système de réparation par les endonucléases AP est si efficace qu'il peut effectuer la dernière étape d'autres voies de réparation. Si une base endommagée peut être excisée, laissant un site AP, l'endonucléase AP peut terminer le travail de restauration de la séquence de type sauvage. C'est ce qui se produit dans le cas du système de réparation par les ADN glycosylases.

Le système GO. Deux glycosylases produites respectivement par les gènes *mutM* et *mutY*, agissent de concert pour prévenir l'apparition de mutations provoquées par la présence de 8–oxodG ou «GO» dans l'ADN (figure 19-10). Ces glycosylases auxquelles s'ajoute le produit du gène *mutT* dont nous avons parlé précédemment, constituent le système GO. Lorsque des lésions GO apparaissent dans l'ADN par oxydation spontanée, la glycosylase codée par *mutM* élimine la lésion (figure 19-36). Quelques lésions GO perdurent toutefois et introduisent une adénine mal appariée. Une deuxième glycosylase codée par *mutY* élimine l'adénine de ces sites d'appariement incorrect, ce qui permet à la synthèse de réparation par l'ADN polymérase I d'y réintroduire la cytosine correcte, puis à MutM d'éliminer enfin la lésion GO.

MutT empêche l'incorporation de GO vis-à-vis de A ; en absence de MutT, MutY créerait un site AP en regard de la lésion GO, ce qui produirait finalement une mutation AT → CG (figure 19-36c). (L'incorporation de GO vis-à-vis de C pourrait être réparée par MutM - figure 19-36c.) Les activités enzymatiques équivalentes de MutM, mutT et mutY ont été identifiées chez l'Homme.

Réparation post-réplicative

RÉPARATION DES DÉFAUTS D'APPARIEMENT. Certains systèmes de réparation peuvent reconnaître des lésions même après le passage de la fourche réplicative. L'un d'entre eux, le **système de réparation des défauts d'appariement**, détecte les mauvais appariements qui se produisent pendant la réplication. Admettons que vous puissiez inventer le système enzymatique capable de réparer des erreurs après la réplication. Quelles propriétés lui donneriez-vous ? Nous en voyons au moins trois :

1. Il devrait reconnaître les bases mal appariées.
2. Il devrait pouvoir déterminer, au sein d'une paire incorrecte, laquelle des deux bases est fautive
3. Il devrait pouvoir exciser la base mal appariée et effectuer une synthèse de réparation.

La deuxième propriété est cruciale pour un tel système. Si cette discrimination n'était pas possible, le système exciserait de manière aléatoire la base correcte ou la base incorrecte et introduirait donc des mutations lors de la réparation. Prenons une paire anormale de bases G - T. G et T sont des constituants habituels de l'ADN. Comment le système peut-il distinguer laquelle des deux est correcte ? Les erreurs de réplication produisent des mauvais appariements sur le brin néosynthétisé. C'est donc sur ce brin-là que doit s'effectuer l'excision et la réparation.

Pour distinguer l'ancienne fibre de la nouvelle, le système de réparation des paires défectueuses tire profit de modifications qui se produisent sur certaines bases après la réplication. L'enzyme importante dans ce cas-ci est l'**adénine méthylase** qui modifie la séquence :

5' - G - A - T - C - 3'
3' - C - T - A - G - 5'

sur chaque brin, en méthylant les adénines en position 6. Toutefois, l'adénine méthylase prend quelques minutes pour reconnaître et modifier les séquences GATC nouvellement synthétisées. Pendant cet intervalle de temps le système de réparation des mauvais appariements peut opérer et, selon leur degré de méthylation, distinguer l'ancien brin du brin néosynthétisé. La méthylation en position 6 n'altère en rien l'appariement de l'adénine mais étiquette la base pour d'autres enzymes. La figure 19-37 montre une fourche de réplication. Remarquez que, juste après la réplication, seule la fibre ancienne est méthylée au niveau des séquences GATC.

Figure 19-36. Le système GO. (a) La 8–oxo–7,8–dihydrodésoxyguanine (GO). Voici la structure de la forme tautomère prédominante de la lésion GO. (b) Les lésions GO produites par oxydation peuvent être éliminées par le produit du gène *mutM* (la protéine MutM) et une réparation peut ensuite rétablir la paire G–C originale. La synthèse réplicative en regard de la lésion est souvent incorrecte et incorpore le plus souvent une adénine (A). La glycosylase MutY élimine l'adénine des paires incorrectes A–GO. Les ADN polymérases de réparation sont moins enclines à l'erreur et incorporent une cytosine (C) en regard de la lésion. La paire C–GO est un substrat pour MutM. (c) L'oxydation peut aussi produire de la 8–oxodGTP à partir de dGTP dans le pool des désoxyribonucléotides. Mut T hydrolyse la 8–oxodGTP en 8–oxodGMP et l'élimine ainsi du pool des désoxynucléotides triphosphates. Si elle n'était éliminée, la 8–oxodGTP pourrait être incorporée en regard de résidus A, ce qui produirait des appariements A–GO incorrects. MutY pourrait être impliqué dans ce processus mutationnel parce qu'il manipule les substrats A–GO et pourrait éliminer A, générant une des transversions AT – CG caractéristiques des souches *mutT*. La 8–oxodGTP pourrait également être incorporée en face d'une cytosine, produisant une paire C–GO incorrecte qui pourrait être éliminée par MutM. (Extrait de M. Michaels and J.H. Miller, *Journal of Bacteriology* 174, 6231 (1992).)

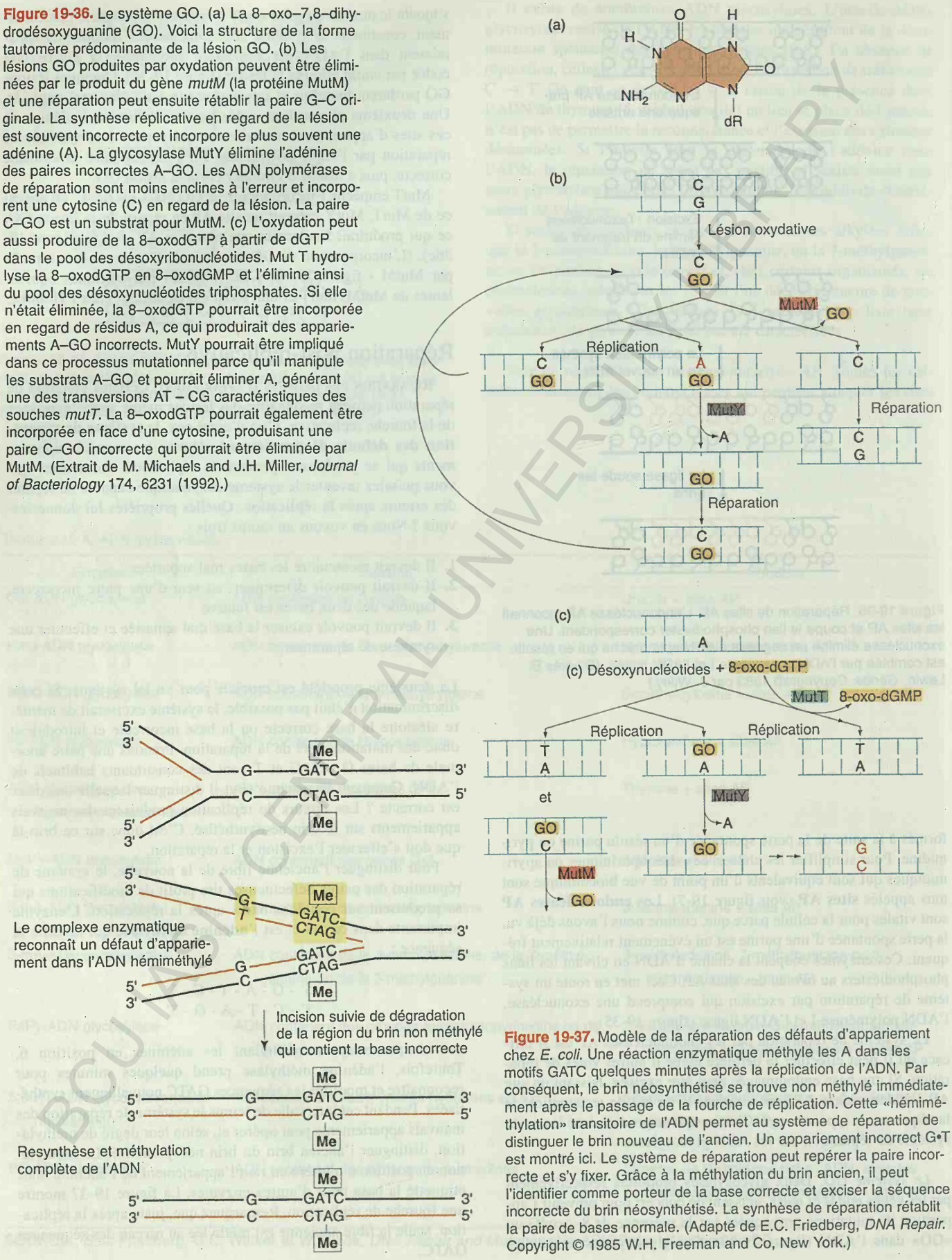


Figure 19-37. Modèle de la réparation des défauts d'appariement chez *E. coli*. Une réaction enzymatique méthyle les A dans les motifs GATC quelques minutes après la réplication de l'ADN. Par conséquent, le brin néosynthétisé se trouve non méthylé immédiatement après le passage de la fourche de réplication. Cette «hémiméthylation» transitoire de l'ADN permet au système de réparation de distinguer le brin nouveau de l'ancien. Un appariement incorrect G•T est montré ici. Le système de réparation peut repérer la paire incorrecte et s'y fixer. Grâce à la méthylation du brin ancien, il peut l'identifier comme porteur de la base correcte et exciser la séquence incorrecte du brin néosynthétisé. La synthèse de réparation rétablit la paire de bases normale. (Adapté de E.C. Friedberg, *DNA Repair*. Copyright © 1985 W.H. Freeman and Co, New York.)

BCU ALAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

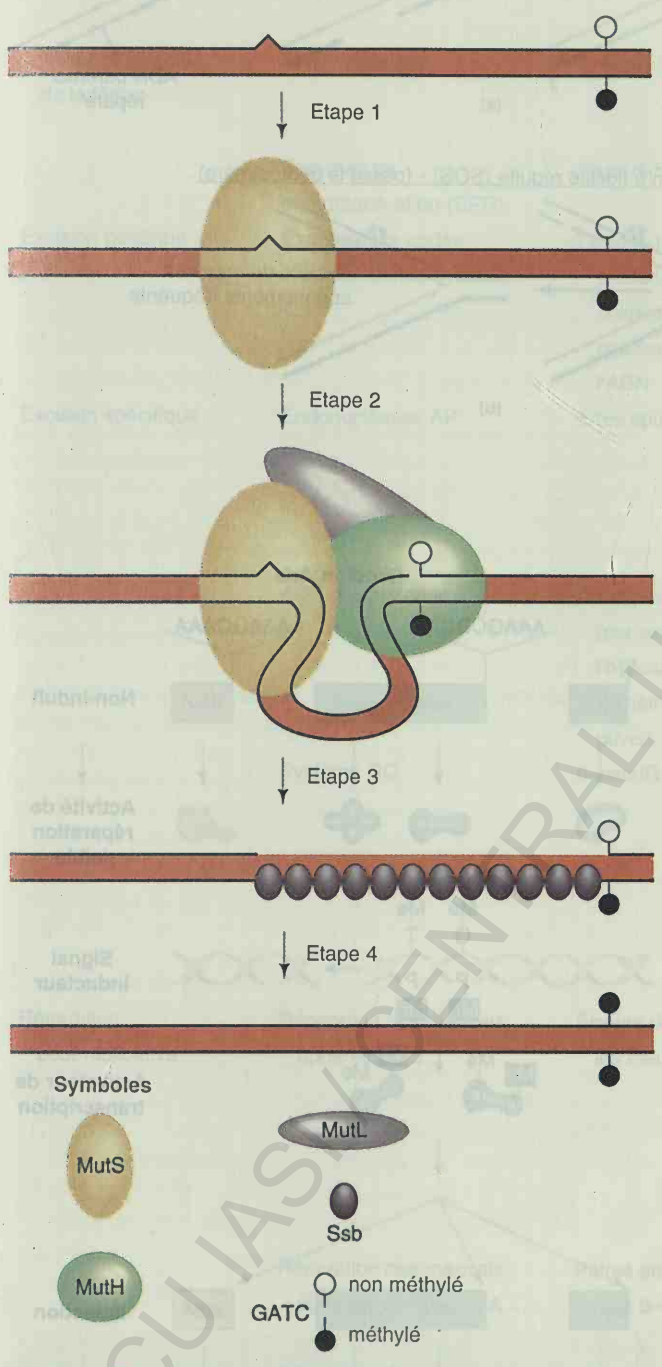


Figure 19-38. Etapes de la réparation des appariements incorrects chez *E. coli*. (1) MutS se fixe au défaut d'appariement. (2) MutH et MutL sont recrutées dans un complexe et MutH (H) coupe le brin néosynthétisé (non méthylé). Une dégradation exonucléolytique s'ensuit, qui dépasse le site du défaut d'appariement et crée une brèche monocaténaire. (3) Des protéines Ssb (Single strand binding en anglais) protègent la région monocaténaire en face de la brèche. (4) La brèche est réparée par synthèse et ligature. (Extrait de J. Jiricny, *Trends in Genetics*, Vol. 10, Elsevier Trends Journals, Cambridge, U.K., 1995.)

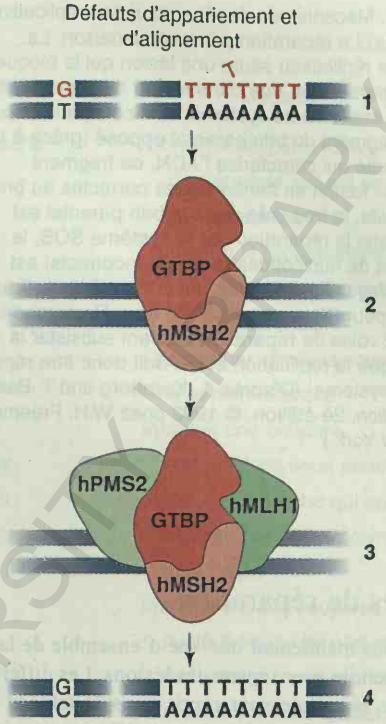


Figure 19-39. Réparation des défauts d'appariement chez l'être humain. (1) Des défauts d'appariement et des alignements fautifs sont produits à la réplication. (2) La protéine de fixation des G•T (GTBP pour G•T Binding Protein en anglais) et la protéine humaine homologue de Mut S (hMSH2) repèrent les appariements incorrects. (3) Deux protéines supplémentaires, hPMS2 et hMLH1, sont recrutées pour former un complexe de réparation élargi. (4) Le défaut d'appariement est réparé, après élimination, synthèse d'ADN et ligature. (Extrait de P. Karran, *Science*, 268, 1857 (1995).)

Une fois qu'un défaut d'appariement a été détecté, le système de réparation corrige l'erreur. Un modèle expliquant le mécanisme de cette correction chez *E. coli* est représenté sur la figure 19-38.

Un système de réparation des paires de bases incorrectes a été mis en évidence chez l'Homme. Deux des protéines qui y participent, hMSH2 et hMLH1, ressemblent beaucoup à leurs équivalents bactériens, MutS et MutL. La figure 19-39 montre comment la protéine hMSH2 et la protéine qui se fixe sur les paires G - T (GTBP, pour GT-Binding Protein, en anglais) s'attachent aux appariements incorrects, puis recrutent les autres éléments du système, hPMS2 et hMLH1, pour effectuer la réparation.

RÉPARATION PAR RECOMBINAISON. Le gène *recA*, nous l'avons vu, est impliqué dans le by-pass SOS (figure 19-22). Il l'est aussi dans la réparation post-réplicative. La réplication de l'ADN est bloquée par les photodimères ou par la présence d'autres types de lésions. Elle reprend au-delà du site endommagé, laissant une brèche monocaténaire dans l'ADN. Lors de la réparation post-réplicative, cette brèche est comblée par de l'ADN prélevé dans le brin parental homologue (figure 19-40a). Ce système semble n'induire que peu d'erreurs, contrairement au by-pass SOS qui est extrêmement mutagène ; en effet, dans ce dernier cas, le système de réplication continue au-delà de la lésion et tolère la non-complémentarité pour la synthèse du nouveau brin (figures 19-22 et 19-40b).

CU IAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

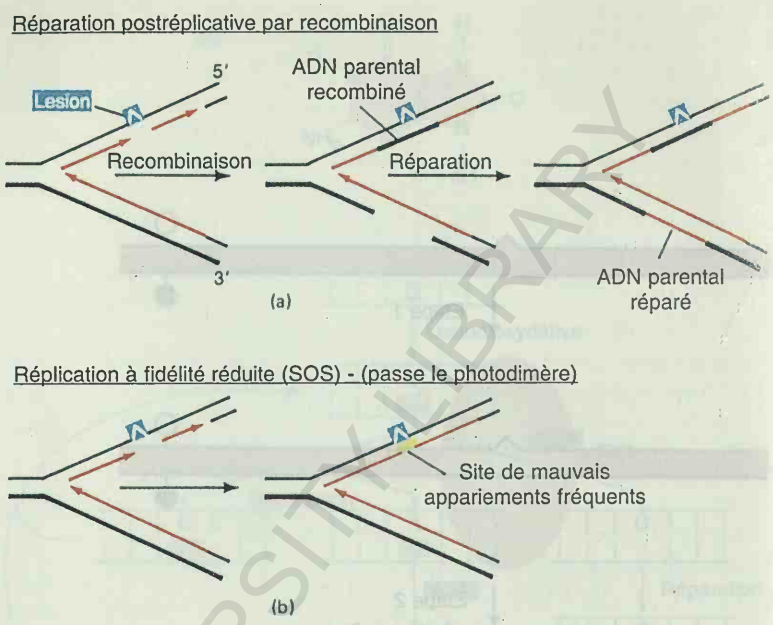


Figure 19-40. Mécanismes de réparation postréplicative des lésions. (a) La réparation par recombinaison. La machinerie de réplication saute une lésion qui la bloque, ce qui fait apparaître un trou dans le brin néosynthétisé. Une protéine associée au système *recA* comble le trou en utilisant un fragment du brin parental opposé (grâce à la complémentarité qui caractérise l'ADN, ce fragment «bouche-trou» fournit en fait les bases correctes au brin réparé). Ensuite, le trou créé dans le brin parental est réparé. (b) Dans la réparation par le système SOS, le nombre requis de nucléotides (souvent incorrects) est incorporé en regard de la lésion qui a bloqué la réplication et celle-ci se poursuit sans laisser de trou. Remarquons que ces deux voies de réparation laissent subsister la lésion qui boque la réplication et qui doit donc être réparée par un autre système. (D'après A. Kornberg and T. Baker, *DNA Replication*, 2è édition. © 1992 chez W.H. Freeman and Co., New York.)

Stratégies de réparation

Nous avons maintenant une vue d'ensemble de la stratégie utilisée par la cellule pour réparer les lésions. Les différents systèmes dont dispose la cellule sont repris dans le tableau 19-5. L'idéal serait évidemment d'avoir une batterie d'enzymes spécifiques destinées, chacune, à éliminer directement une espèce de lésion particulière. Mais ce serait là une perte d'énergie considérable ; il faudrait que la cellule synthétise autant d'enzymes qu'il y a de types de lésions possibles. La cellule économise l'énergie en utilisant un système général d'excision pour toutes les lésions qui provoquent une distorsion dans la double hélice d'ADN. Lorsque la lésion est plus discrète, des enzymes spécifiques, comme les glycosylases, sont utilisées. Enfin, pour éliminer les erreurs de réplication, un système post-réplicatif comble les brèches laissées par les autres systèmes en regard de lésions qui bloquent la progression de la fourche de réplication.

Une série de systèmes de réparation sont induits par les lésions. Nous avons décrit le système SOS (voir la figure 19-22) et plusieurs des protéines actives dans la réparation des alkylations. La régulation de ce dernier système, qu'on appelle la *réponse adaptative*, est décrite sur la figure 19-41.

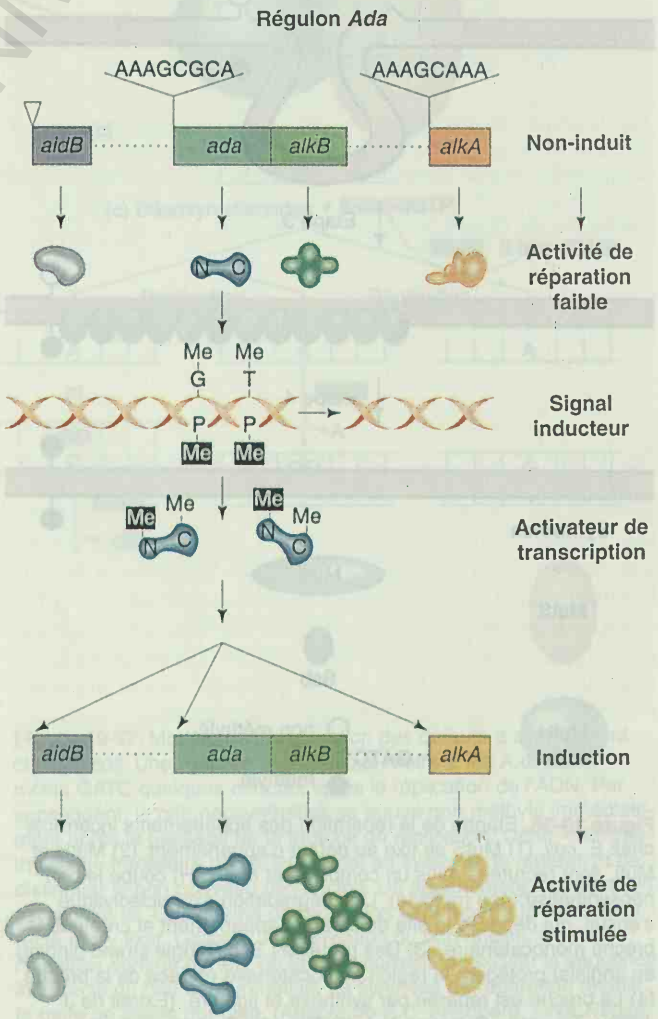


Figure 19-41. Régulation des gènes codant pour les enzymes de réparation des alkylations. Les quatre gènes représentés ici constituent le régulon *Ada*. Des séquences communes aux promoteurs des deux unités de transcription sont montrées (Boîtes «Ada»). Lorsqu'*E. coli* est exposé à des agents méthylants, plusieurs sites sur l'ADN sont méthylés, parmi lesquels la position O-6 de la guanine, la position O-4 de la thymine et les phosphates du squelette sucre-phosphate. La protéine Ada transfère les groupes méthyle sur des résidus cystéine près de son extrémité amino (s'il proviennent de phosphates) ou près de son extrémité carboxyle. Quand la cystéine acceptrice N-terminale a lié un groupe méthyle, l'enzyme subit un changement de conformation qui lui permet d'activer les promoteurs des gènes du régulon Ada, avec comme résultat une production accrue des enzymes de réparation des alkylations. (D'après L. Lindahl et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 57, 133-157 (1988).)

Tableau 19-5. Les systèmes de réparation d'*E. coli*.

Mode d'action général	Exemple	Type de lésion réparée	Mécanisme
Détoxification	Superoxide dismutase	Empêche la formation de lésions	Convertit les peroxydes en peroxyde d'hydrogène, qui est neutralisé par la catalase
Elimination directe de la lésion	Alkyltransférase	O-6-alkylguanine	Transfère le groupe alkyle de la O-6-guanine à une cystéine de la transférase
	Enzymes de photoréactivation (EPR)	Photodimères UV	Coupent les dimères sous l'effet de la lumière blanche
Excision générale	Exonucléase codée par les gènes *uvrABC*	Lésions telles que les photo-produits UV ou les radicaux chimiques encombrants qui causent une distorsion dans l'ADN	Introduit une coupure endonucléolytique au niveau de la lésion ; la brèche qui en résulte est réparée par l'ADN polymérase I et la ligase
Excision spécifique	Endonucléases AP	Sites apuriniques	Introduisent des coupures endo-nucléolytiques de part et d'autre de la lésion ; une exonucléase crée une brèche qui est réparée par l'ADN polymérase I et la ligase
	ADN glycosylases	Certaines bases désaminées (par exemple, l'uracile ou l'hypoxanthine), certaines bases déméthylées, des purines à cycle ouvert, et d'autres bases modifiées	Eliminent la base en créant un site AP qui est réparé par l'endonucléase AP
	Système GO	8–oxodG	Une glycosylase élimine la 8–oxodG de l'ADN ; une autre glycosylase convertit les paires incorrectes 8–oxodG - dA qui subsistent en paires 8–oxodG - dC et la première glycosylase élimine ensuite la 8–oxodG
Réparation post-réplicative	Réparation des mauvais appariements	Erreurs de réplication provoquant les mauvais appariements	Ce système reconnaît le brin néosynthétisé en détectant les A non méthylées dans les séquences 5'-GATC-3' ; il excise la base du brin nouvellement synthétisé lorsqu'il détecte un mauvais appariement
	Réparation des mauvais appariements dG - dA	Paires erronées dG - dA Paires 8–oxodG - dA	Excision suivie de resynthèse ; mécanisme de reconnaissance des brins mal connu
	Réparation par recombinaison	Lésions qui bloquent la réplication et provoquent des brèches mono-caténaires	Echange par recombinaison
	Système SOS	Lésions qui bloquent la réplication	La réplication franchit la lésion, ce qui provoque souvent l'apparition d'une mutation en regard de la lésion

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Message Les enzymes de réparation jouent un rôle essentiel en limitant le nombre des lésions génétiques qui apparaissent dans les cellules vivantes. La cellule dispose de nombreux systèmes de réparation pour éliminer les erreurs potentiellement mutagènes.

Les mutateurs

Comme le laisse présager la présence de systèmes de réparation, les cellules normales sont programmées pour éviter les erreurs. Les processus de réparation sont tellement efficaces que les substitutions de bases n'apparaissent chez *E. coli* qu'à une fréquence de 10^{-10} à 10^{-9} par paire de bases et par génération. On a cependant pu isoler des souches mutantes qui présentent un taux plus élevé de mutations spontanées. On appelle ces mutants des **mutateurs** (ou porteurs d'un gène mutateur). Souvent le phénotype mutateur résulte de l'inactivation de l'un ou l'autre système de réparation.

Chez *E. coli,* les mutations aux loci *mutH, mutL, mutU* et *mutS* touchent des composants du système de réparation post-réplicatif (voir la figure 19-38). Il en est de même pour *dam* qui code pour l'enzyme désoxyadénosine méthylase. Les souches Dam$^-$ ne peuvent pas méthyler les adénines des séquences GATC (figure 19-37). De ce fait, le système de réparation des paires défectueuses ne peut plus distinguer l'ancienne fibre de la nouvelle. Il en résulte un taux plus élevé de mutations spontanées.

Les mutations au locus *mutY* provoquent l'apparition de transversions GC → TA puisqu'elles affectent le système de réparation qui élimine nombre d'appariements G - A et tous les appariements de la 8–oxodG (voir le système GO décrit précédemment). Le gène *mutM* code pour une glycosylase qui élimine la 8–oxodG. Les mutants *mutM*$^-$ sont des mutateurs qui produisent des transversions G•C→A•T. Les souches *MutT*$^-$ ont un taux élevé de transversions A•T→C•G puisqu'il leur manque une activité enzymatique qui empêche l'incorporation de 8–oxodG en regard de l'adénine.

Les mutants *ung*$^-$ ne synthétisent plus l'uracile ADN glycosylase. Ils présentent un taux élevé de transitions C → T parce qu'ils ne peuvent plus réparer les cytosines désaminées. Les mutations au locus *mutD* sont responsables d'un taux très élevé de mutations spontanées (au moins 1000 fois supérieur à la normale). Elles affectent la fonction d'édition de l'ADN polymérase III (chapitre 11).

Déficiences des systèmes de réparation et maladies humaines

Plusieurs maladies génétiques humaines sont dues à des déficiences des systèmes de réparation. Ces déficiences conduisent souvent à une incidence accrue de cancers. Le tableau 19-6 décrit quelques unes des maladies dues à ces déficiences. Les mutations qui en sont la cause sont en générale autosomiques récessives.

Xeroderma pigmentosum (XP) résulte d'une mutation dans n'importe lequel des huit gènes (groupes de complémentation) impliqués dans la réparation par excision de nucléotides (voir la partie gauche de la figure 19-31). Les personnes atteintes ont tendance à développer des cancers de la peau induits par les UV de la lumière solaire (figure 19-42) et présentent fréquemment des désordres neurologiques. La différence de sensibilité aux UV des cellules malades et des cellules normales est illustrée par les courbes de survie de la figure 19-43.

Le **syndrome de Bloom** associe une fréquence anormalement élevée de remaniements chromosomiques et une déficience en ADN ligase. Les patients ont un retard de croissance et présentent des dilatations des vaisseaux sanguins de la peau (télangiectasies), particulièrement au niveau du visage. La fréquence d'apparition de

Tableau 19-6. Maladies humaines liées à des déficiences des systèmes de réparation de l'ADN.

Maladie	Agent responsable	Cancer pouvant en résulter	Groupes de complémentation	Symptômes
Ataxie télangiectasie	Irradiation γ	Lymphomes	5	Ataxie, dilatation des vaisseaux sanguins (télangiectases) de la peau et des yeux, aberrations chromosomiques, dysfonction du système immunitaire
Syndrome de Bloom	Agents alkylants peu puissants	Carcinomes, leucémies, lymphomes	1	Sensibilité à la lumière, télangiectases faciales, altérations chromosomiques
Syndrome de Cockayne	Ultraviolets		2	Nanisme, atrophie rétinienne, sensibilité à la lumière, vieillissement précoce, surdité, trisomie 10
Anémie de Fanconi	Agents pontants	Leucémies	3	Pancytopénie hypoplasique, anomalies congénitales
Xeroderma pigmentosum	Ultraviolets Mutagènes chimiques	Carcinomes de la peau et mélanomes	8	Sensibilité des yeux et de la peau à la lumière, kératoses
CCNPH		Colon, ovaire	4	Développement précoce de tumeurs

NOTE : D'autres maladies héréditaires humaines qui pourraient provenir de déficiences des systèmes de réparation de l'ADN comprennent le syndrome de Zinsser - Cole - Engman (diskeratosis congenita), le syndrome de Hutchinson - Gilford (sénilité précoce) et la trichothiodystrophie. CCNPH : cancer colorectal non-polypeux héréditaire.
SOURCE : A. Kornberg and T. Baker, *DNA Replication*, 2è éd.© 1992 par W. H. Freeman and Co, New York

BCU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR

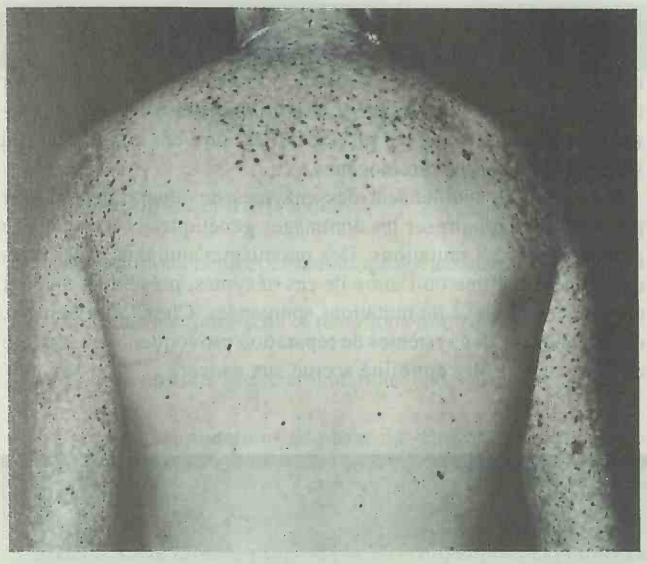


Figure 19-42. Cancer de la peau chez un individu atteint de la maladie héréditaire *Xeroderma pigmentosum*. Cette maladie héréditaire récessive est causée par une déficience dans l'un des enzymes nécessaires à la réparation par excision, ce qui mène à la formation de cancers de la peau lors de l'exposition aux UV de la lumière solaire. (Photographie par Dirk Bootsma, Université Erasmus, Rotterdam.)

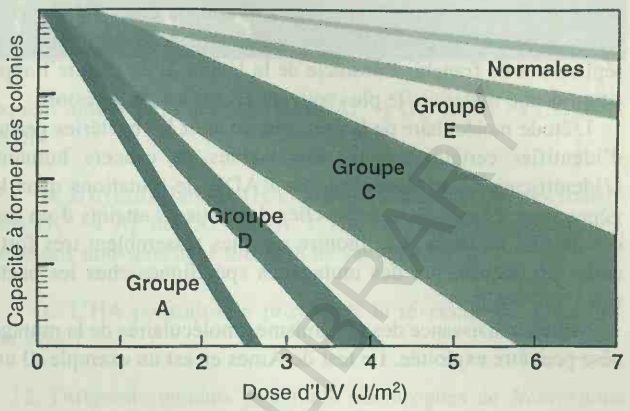


Figure 19-43. Hypersensibilité des cellules XP à lumière UV. Des cultures de cellules de plusieurs groupes de complémentation ont été comparées. La sensibilité varie entre les groupes, mais tous présentent une sensibilité accrue par rapport aux cellules normales. (D'après J.E. Cleaver et K.H. Kraemer, *Xeroderma pigmentosum*, in C.R. Scriver et al., *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Copyright © 1989, McGraw-Hill Book Co., New York.)

cancers est élevée chez ces patients : la plupart développent un cancer avant l'âge de 30 ans. Le **syndrome de Werner** est également un phénotype mutateur qui se manifeste par un nombre élevé de délétions chromosomiques. Les patients présentent un vieillissement prématuré. La nature exacte de la mutation n'a pas encore été identifiée.

Des déficiences des systèmes de réparation des lésions induites par les UV sont à l'origine du **syndrome de Cockayne (SC)** qui se caractérise par le nanisme et le vieillissement prématuré. Les cellules SC sont déficientes pour une des protéines qui couplent la transcription et la réparation et sont donc incapables de réparer préférentiellement l'ADN qui est activement transcrit (voir figure 19-33).

L'**anémie de Fanconi (AF)** présente une variété de symptômes anormaux, tels qu'une petite stature, l'hyperpigmentation et l'aplasie radiale. On observe également des niveaux anormalement bas des constituants du sang (leucocytes, érythrocytes et plaquettes). Les cellules AF semblent déficientes pour la réparation des pontages entre les brins de l'ADN, mais il n'est pas certain que la déficience du système de réparation soit la cause première des anomalies qui caractérisent cette maladie.

Les personnes souffrant d'**ataxie télangiectasie (AT)** présentent des anomalies des systèmes nerveux et immunitaires et une tendance accrue à développer des lymphomes, le plus souvent avant l'age de 20 ans. Les cas sévères s'accompagnent d'un retard mental progressif et d'une perte de coordination musculaire. Les cellules des patients AT sont extrêmement sensibles aux radiations ionisantes. Elles présentent des taux élevés de remaniements chromosomiques . La nature exacte de la déficience des systèmes de réparation des cellules AT n'est pas encore connue.

Le **cancer colorectal non-polypeux héréditaire (CCNPH)** est une des prédispositions héréditaires au cancer les plus communes qui affecte 1 individu sur 200 dans le monde occidental. Des études récentes ont montré que ce syndrome résulte de la perte du système de réparation des défauts d'appariement. La plupart des CCNPH résulte d'une déficience d'un des des gènes qui sont les homologues humains de *mutS* et *mutL* (reportez-vous à la figure 19-38). La transmission du CCNPH est autosomique dominante. Les cellules qui contiennent un exemplaire fonctionnel des gènes de correction des défauts d'appariement ont une activité de réparation normale, mais les tumeurs se développent à partir des lignées cellulaires qui ont perdu leur unique exemplaire fonctionnel. Ces cellules présentent des taux de mutation élevés qui aboutissent au développement et à la prolifération de tumeurs.

RÉSUMÉ

Les mutations géniques se produisent par des mécanismes très divers. Les mutations spontanées peuvent résulter d'erreurs au cours de la réplication de l'ADN ou de lésions spontanées comme celles qui sont provoquées par la dépurination ou la désamination. (Comme nous le verrons dans les chapitres 20 et 21, la recombinaison et les éléments transposables peuvent aussi provoquer des altérations dans les gènes.) Les mutagènes augmentent la fréquence de mutations. Certains d'entre eux agissent en imitant une base mais en s'appariant de manière différente de celle-ci au cours de la réplication. D'autres modifient les bases et les transforment en dérivés qui, eux, s'apparient différemment. Une troisième classe, qui comprend la plupart des carcinogènes, endommage l'ADN au

point de bloquer la réplication. L'activation d'une voie enzymatique, appelée système SOS, est nécessaire pour permettre à la réplication de franchir l'obstacle de la lésion. Il en résulte l'apparition d'une mutation, le plus souvent en regard de la lésion.

L'étude moléculaire de la mutagénèse chez les bactéries permet d'identifier certains agents responsables de cancers humains. L'identification par séquençage de l'ADN de mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs chez des patients atteints d'un cancer du foie ou de la peau montre qu'elles ressemblent très fort à celles provoquées par des mutagènes spécifiques chez les bactéries.

Notre connaissance des mécanismes moléculaires de la mutagénèse peut être exploitée. Le test de Ames en est un exemple. Il utilise des souches bactériennes mutantes pour tester le pouvoir mutagène de substances présentes dans notre environnement. Etant donné la corrélation qui existe entre pouvoir mutagène et pouvoir carcinogène, ce même test peut être utilisé pour identifier rapidement, et à peu de frais, les substances de notre environnement qui sont potentiellement carcinogènes.

Les cellules synthétisent des enzymes de réparation qui leur permettent de minimiser les dommages génétiques et d'éviter une grande partie des mutations. Des organismes mutants, incapables de synthétiser l'une ou l'autre de ces enzymes, présentent un taux anormalement élevé de mutations spontanées. Chez l'être humain, des déficiences des systèmes de réparation provoquent une série de maladies et une susceptibilité accrue aux cancers.

Diagramme conceptuel

Faites un schéma qui relie entre eux le plus grand nombre des termes suivants. Remarquez que ces termes ne sont pas présentés dans un ordre particulier.

mutation / auxotrophe / transition / décalage du cadre de lecture/ mutation de phase / transversion / agent mutagène / photoréactivation / mutateur / SOS / maladie génétique / acide aminé

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Dans le chapitre 13, nous avons appris que les codons ambre et ocre sont deux des triplets terminateurs de chaîne. En vous basant sur les spécificités de l'aflatoxine B_1 et de l'EMS, discutez la possibilité d'obtenir des réversions vers le type sauvage de mutations ambre (codon UAG) et ocre (codon UAA) par traitement avec ces deux mutagènes.

Solution

L'EMS induit essentiellement des transitions G - C → A - T. Le codon UAG ne pourra donc pas réverser vers le type sauvage sous l'action de ce mutagène puisque celui-ci ne stimule que des changements UAG → UAA et donc de mutations ambre en mutations ocre. Le codon UAA n'est pas susceptible d'être modifié par l'EMS. L'aflatoxine B_1 stimule essentiellement des transversions G - C → T - A. Donc seule la troisième base du codon UAG est susceptible d'être modifiée par ce second mutagène pour engendrer un codon UAU (au niveau de l'ARNm) qui code pour la tyrosine. Si la tyrosine est acceptable pour la fonction de la protéine mutée, l'aflatoxine B_1 stimulera la réversion de la mutation ambre. Le codon UAA n'est pas susceptible de modification par l'aflatoxine B_1.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Expliquez pourquoi des mutations induites par les acridines chez le phage T4 ou par l'ICR-191 chez les bactéries ne peuvent être induites à réverser par le 5–bromo-uracile.

Solution

Les acridines et l'ICR-191 induisent des mutations en provoquant la délétion ou l'addition d'une ou plusieurs paires de bases. Ceci décale le cadre de lecture. Par contre, le 5–bromo-uracile induit des mutations en provoquant des substitutions de bases. Ce type de mutation ne peut compenser le décalage du cadre de lecture induit par l'ICR-191 et les acridines.

2. Un mutant de *E. coli* présente une résistance très élevée à la mutagénèse par toute une série de mutagènes y compris la lumière U.V., le benzo(a)pyrène et l'aflatoxine B_1. Expliquez les causes possibles du phénotype de ce mutant.

Solution

Ce mutant pourrait présenter une déficience du système SOS ou du gène *umuC*. En effet, de tels mutants seraient incapables d'effectuer le by-pass des lésions du type de celles que provoquent ces trois substances et qui bloquent la progression de la fourche de réplication. Si les lésions prémutationnelles ne sont pas «traitées» par les enzymes appropriées, les mutations ne seront pas récupérées dans des cellules viables.

PROBLÈMES

1. Expliquer les différences entre les membres des paires suivantes :

a. Transitions et transversions

b. Mutations neutres et mutations silencieuses

c. Mutations faux-sens et mutations non-sens

d. Mutations de phase et mutations non-sens

2. Pourquoi les mutations de phase ont-elles plus de chance de provoquer la production de protéines non fonctionnelles que les mutations faux-sens ?

3. Décrivez le modèle proposé par Streisinger pour expliquer la formation de mutations de phase. Montrez comment ce modèle peut aussi expliquer l'existence de points chauds de mutation dans le gène *lacI* de *E. coli.*

4. Décrivez deux mécanismes différents par lesquels pourraient se former les délétions. Qu'est-ce qui, dans la détermination de la séquence nucléotidique, suggère ces deux mécanismes ?

5. Décrivez deux types de lésions spontanées qui peuvent mener à l'apparition d'une mutation.

6. Comparez les mécanismes d'action du 5–bromo-uracile (5–BU) et de l'éthyl-méthane sulfonate (EMS) lors de la formation de mutations. A la lumière de ces mécanismes expliquez la spécificité de ces deux mutagènes.

7. Comparez les deux systèmes de réparation impliqués dans l'élimination des sites apuriniques et des radicaux chimiques volumineux.

8. Décrivez les mécanismes de réparation qui opèrent après la réplication.

9. Les mutants auxotrophes normaux ne poussent pas du tout en l'absence d'additifs appropriés dans le milieu de culture. Toutefois, lorsque l'on isole des mutants auxotrophes, on trouve souvent des mutants qui poussent extrêmement lentement en absence de l'additif et normalement en sa présence. On les appelle des mutants «fuyants» (« leaky » en anglais). Proposez une explication moléculaire pour le comportement de ces mutants.

10. La souche A de *Neurospora* contient une mutation *ad-3* qui réverse spontanément avec une fréquence de 10^{-6}. La souche A est croisée avec une souche de type sauvage nouvellement isolée et l'on récupère les souches *ad-3* dans la descendance. Parmi 28 descendants *ad-3* analysés, 13 s'avèrent réverser à une fréquence de 10^{-6} alors que les 15 restants réversent à une fréquence de 10^{-3}. Proposez une hypothèse qui explique ce résultat et un programme expérimental qui permettrait de la tester.

11. a. Pourquoi n'est-il pas possible d'induire des mutations non-sens (correspondant sur l'ARNm aux triplets UAG, UAA et UGA) en traitant une souche sauvage avec des mutagènes qui provoquent uniquement des transitions AT → GC ou TA → CG dans l'ADN ?

b. L'hydroxylamine (HA) provoque dans l'ADN des transitions GC → AT ou CG → TA. L'HA pourrait-elle produire des mutations non-sens dans une souche sauvage ?

c. L'HA pourrait-elle provoquer la réversion de mutations non-sens ?

12. Différents mutants ponctuels auxotrophes de *Neurospora* sont traités par divers agents mutagènes pour voir s'il se produit des réversions. Les résultats de cette analyse sont les suivants (un + indique la présence de révertants) :

Mutant	5–BU	HA	Proflavine	Réversion spontanée
1	–	–	–	–
2	–	–	+	+
3	+	–	–	+
4	–	–	–	+
5	+	+	–	+

a. Pour chacun des cinq mutants, décrivez, au niveau moléculaire, la nature de l'événement mutationnel de départ (pas de la réversion). Soyez aussi précis que possible.

b. Pour chacun des cinq mutants citez un agent mutagène qui pourrait avoir causé la mutation de départ. (Une mutation spontanée n'est pas une réponse acceptable.)

c. Dans l'expérience de réversion pour la mutation 5, un dérivé prototrophe particulièrement intéressant a été obtenu. Lorsqu'il est croisé avec une souche sauvage standard, la descendance est constituée de 90 % de prototrophes et de 10 % d'auxotrophes. Donnez une explication détaillée de ces résultats, y compris une raison précise pour les fréquences observées.

13. Vous utilisez l'acide nitreux pour faire réverser un allèle mutant *nic*-2 de *Neurospora.* Vous traitez les cellules, les étalez sur un milieu ne contenant pas de nicotinamide, et recherchez les colonies prototrophes. Pour deux allèles mutants vous obtenez les résultats suivants :

a. Avec l'allèle 1 de *nic*-2 vous n'obtenez aucun prototrophe.

b. Avec l'allèle 2 de *nic*-2 vous obtenez 3 colonies prototrophes et vous croisez chacune d'entre elles indépendamment avec une souche sauvage. A partir du croisement prototrophe A × type sauvage vous obtenez 100 descendants qui sont tous prototrophes. A partir du croisement prototrophe B × type sauvage, vous obtenez également 100 descendants parmi lesquels 78 sont prototrophes et 22 requièrent la nicotinamide pour pousser. A partir du croisement prototrophe C × type sauvage vous obtenez 1000 descendants parmi lesquels 996 sont prototrophes et 4 requièrent la nicotinamide.

Expliquez ces résultats au niveau moléculaire et proposez une manière de vérifier vos hypothèses.

UAC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

14. Imaginez des systèmes de criblage pour détecter les types de mutants suivants :

a. Des mutants du système nerveux de la drosophile

b. Des mutants sans flagelle d'une algue unicellulaire haploïde

c. Des mutants bactériens de taille colossale

d. Des mutants qui surproduisent la mélanine, une substance de couleur noire, dans une culture de champignons haploïdes de couleur blanche

e. Des hommes (au sein d'une grande population) dont les yeux polariseraient la lumière

f. Des drosophiles, ou des algues unicellulaires douées de phototropisme négatif

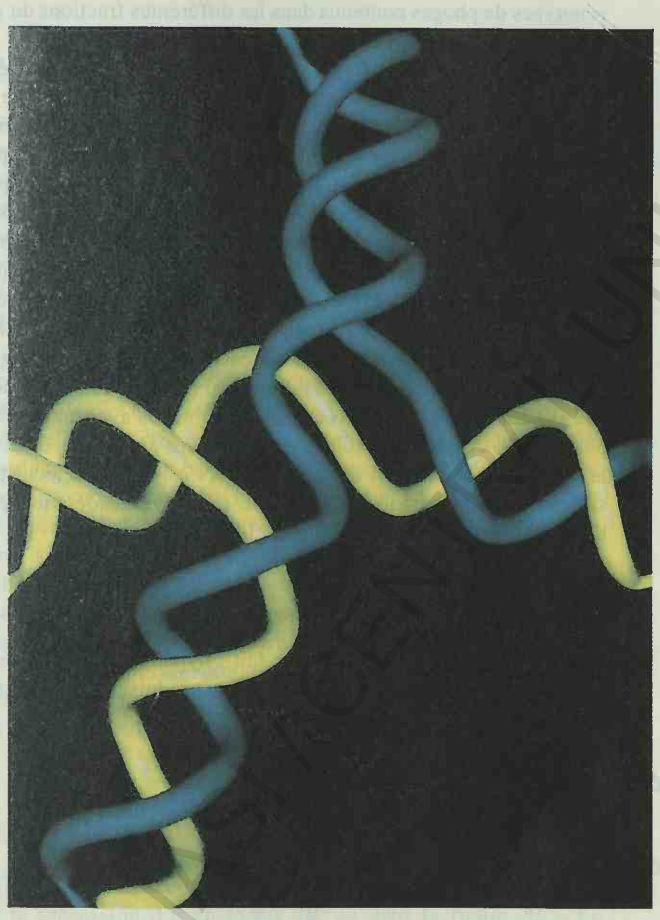
g. Des mutants sensibles aux U.V. chez une levure haploïde

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

20

Les mécanismes du changement génétique II : la recombinaison



Modèle d'un site d'échange génétique, créé par imagerie électronique. (Julie Newdol, Computer Graphics Laboratory, Université de Californie à San Francisco. Droits de reproduction détenus par les Régents de l'Université de Californie.)

CONCEPTS-CLÉS

- La recombinaison se produit entre deux chromosomes, dans des régions homologues, par la rupture et la réunion de fragments d'ADN.
- Les modèles moléculaires de la recombinaison, le modèle de Holliday par exemple, font intervenir la formation d'ADN hétéroduplex, suite à la formation d'un crossing-over. Le point de branchement peut se déplacer pour créer une molécule intermédiaire qui peut être coupée suivant des schémas différents pour produire différentes molécules recombinantes.
- Le modèle de Holliday peut expliquer les résultats des croisements génétiques.
- Bon nombre des enzymes impliquées dans la recombinaison chez les bactéries ont été identifiées.
- Il existe également des systèmes spécifiques de recombinaison qui catalysent exclusivement la recombinaison entre certaines séquences.

BOSTON UNIVERSITY LIBRARY

Un crossing-over normal (c'est-à-dire un événement de recombinaison réciproque entre deux chromosomes) est un processus étonnant. D'une manière ou d'une autre, au cours de chaque méiose, le matériel génétique contenu dans l'un des chromosomes parentaux et celui qui est contenu dans le second chromosome parental peuvent être «coupés et collés» et ceci avec une réciprocité parfaite. En d'autres termes il n'y a ni gain ni perte mais seulement redistribution de matériel génétique. Dans la plupart des cas la conservation est au nucléotide près. Quels sont les mécanismes qui peuvent assurer une telle précision ? Nous ne connaissons pas à l'heure actuelle tous les détails de ces mécanismes moléculaires, mais de nombreuses observations nous permettent de proposer des modèles. Nous pouvons aussi identifier les réactions enzymatiques responsables de plusieurs étapes de la recombinaison.

La recombinaison générale homologue

Certaines recombinaisons ne se produisent qu'au niveau de séquences d'ADN spécifiques. Nous considérerons ces événements particuliers à la fin du chapitre. Nous nous intéresserons d'abord au mécanisme qui produit des recombinaisons au niveau de n'importe quelle longue région d'homologie entre deux chromosomes.

Rupture et réunion de molécules d'ADN

Tout au long de notre analyse de la liaison génétique, nous avons implicitement supposé que les crossing-over se produisent par un mécanisme de rupture et de réunion entre chromatides. Les observations qui vont à l'encontre de l'hypothèse du «copiage sélectif» (chapitre 5) fournissent en fait de bons arguments, quoiqu'*indirects*, en faveur de ce mécanisme de rupture et réunion. Il existe en outre des arguments génétiques et cytologiques en faveur de ce mécanisme : il semble que la recombinaison se produise au stade prophase de la méiose et non au stade interphase (celui au cours duquel l'ADN se réplique). Un peu d'ADN est synthétisé pendant la prophase, mais il ne fait pas de doute que la réplication n'est pas associée à la formation de crossing-over. C'est une expérience faite par Matthew Meselson et Jean Weigle en 1961 qui apporta l'une des premières preuves de la rupture et de la réunion de fragments de chromosomes (bien qu'il se soit agi de chromosomes viraux).

Meselson et Weigle réalisèrent une infection mixte d'*E.coli* par deux souches du bactériophage λ. L'une portait les marqueurs *c* et *mi* à l'une des extrémités de son chromosome et fut cultivée dans un milieu contenant des isotopes lourds du carbone et de l'azote (^{13}C et ^{15}N) de manière à ce que l'ADN des phages obtenus fût «lourd». L'autre souche était sauvage (c^+mi^+) et fut cultivée dans un milieu normal (contenant du ^{12}C et du ^{14}N) de telle sorte que son ADN était «léger». La figure 20-1a représente les deux types de chromosomes parentaux. Les bactéries infectées par les deux types de phages furent cultivées en milieu normal (léger) jusqu'à ce qu'elles lysent et produisent des phages.

Les phages produits, descendants des types parentaux, furent centrifugés dans un gradient de chlorure de césium de manière à être séparés en fonction de leur densité. Après centrifugation, le gradient présentait une large bande, ce qui indiquait que la densité des phages obtenus était très variable, tout en se situant entre les limites de la densité du parent contenant de l'ADN «lourd» et celle du parent contenant de l'ADN «léger» (voir figure 20-1b). Les génotypes de phages contenus dans les différentes fractions du gradient furent analysés. Certains recombinants s'avérèrent avoir une densité très proche de celle du parent «lourd». Ils avaient le génotype *c mi*$^+$ et ne pouvaient donc résulter que d'un échange entre ces deux marqueurs (figure 20-1c). La densité élevée de ces recombinants s'explique si l'on admet qu'ils n'ont reçu qu'un très petit fragment d'ADN léger portant le marqueur *mi*$^+$. Comme l'on pouvait s'y attendre, lorsque des phages lourds, c^+ *mi*$^+$, furent croisés avec des phages légers *c mi*, les recombinants lourds avaient le génotype c^+mi et les recombinants légers avaient le phénotype *c mi*$^+$. Ces résultats ne peuvent s'expliquer que d'une seule manière : il faut que l'événement de recombinaison se soit produit par la rupture physique et la réunion de segments d'ADN lourds et légers. Nous devons évidemment être prudents si nous voulons extrapoler aux systèmes eucaryotiques ces résultats obtenus avec un bactériophage. Mais ce que ces résultats montrent sans ambiguïté, c'est que la coupure et la réunion de fibres d'ADN est chimiquement possible et que ce phénomène peut être pris en considération pour l'élaboration de modèles expliquant la recombinaison.

Les chiasmas : les sites de crossing-over

Dans le chapitre 5, nous avions fait l'hypothèse simple que les chiasmas seraient en fait les sites où se produisent les crossing-

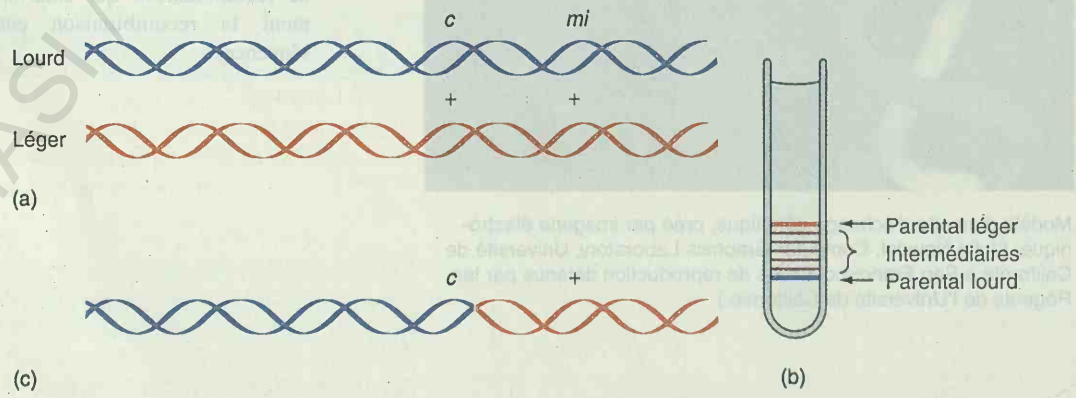


Figure 20-1. Démonstration de la rupture et de la réunion de chromosomes chez le phage λ. (a) Les chromosomes des deux souches de λ utilisées pour infecter *E.coli*. (b) Les bandes produites lors de la centrifugation en gradient de densité de chlorure de césium des phages produits à la suite de l'infection mixte. Le fait que des phages de densités intermédiaires soient produits indique que la composition des chromosomes des phages est hétérogène (en partie lourds et en partie légers). (c) Les chromosomes des phages de génotype *c mi*$^+$, résultats d'une recombinaison entre les deux marqueurs. La densité de ces produits de la recombinaison indique qu'il y a eu rupture et réunion de molécules d'ADN.

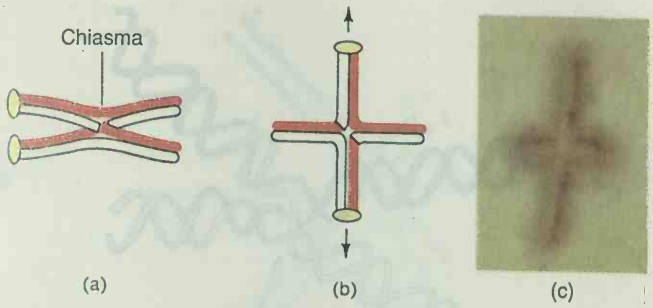


Figure 20-2. Crossing-over entre des chromatides non-sœurs de couleur sombre et claire durant la méiose du criquet. (a) Représentation du chiasma. (b) Le moment le plus propice pour l'observation se situe lorsque les centromères se sont légèrement séparés, formant une structure en croix avec le chiasma au centre. (c) Photographie du stade schématisé en (b). (Photo fournie par C. Tease et G.H. Jones, *Chromosoma* 69, 1978, 163-178.)

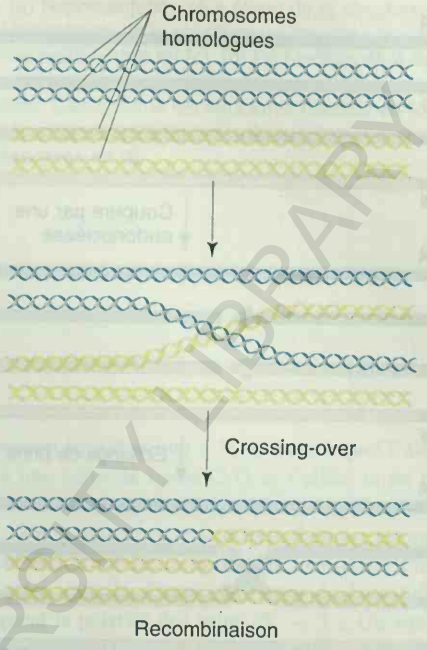


Figure 20-3. L'événement moléculaire de la recombinaison peut être représenté par deux doubles hélices d'ADN qui se rompent et se réunissent. (D'après J. Darnell, H. Lodish et D. Baltimore, *Biologie moléculaire de la cellule*, 2è éd., Copyright 1993, De Boeck Université, De Boeck-Wesmael, Bruxelles.)

over. Les résultats des analyses de localisation de gènes sont en accord avec cette hypothèse : étant donné qu'une moyenne de 1 crossing-over par méiose correspond à 50 unités de cartographie génétique, on s'attend à trouver une relation directe entre la longueur de la carte génétique d'un chromosome et le nombre moyen de chiasmas observés par méiose. Chez les organismes pour lesquels une carte génétique détaillée est disponible, cette corrélation a effectivement pu être établie.

La technique de coloration des chromosomes arlequin (voir le chapitre 11) a permis de tester directement cette hypothèse. En 1978, C. Tease et G.H. Jones préparèrent des chromosomes arlequin sur des cellules de criquet en méiose. Rappelons que la technique de coloration en arlequin permet de distinguer les chromatides sœurs, l'une est sombre, l'autre est claire. Lorsqu'un crossing-over se produit, il peut faire intervenir soit deux chromatides sombres, soit deux claires soit deux chromatides non sœurs, l'une claire et l'autre sombre. C'est cette dernière situation qui nous intéresse ici parce qu'un crossing-over entre ces deux chromatides produit des molécules en partie sombres et en partie claires. Tease et Jones observèrent que les transitions sombre-clair se localisaient exactement au niveau des chiasmas. Ceci leva le doute sur une question qui restait sans réponse depuis le début du siècle (figure 20-2).

Le modèle de Holliday

Tout modèle de recombinaison se doit de prendre en considération la succession d'événements décrite dans la figure 20-3. Le modèle le plus cohérent fut à l'origine proposé par Robin Holliday pour expliquer le phénomène de conversion génique (voir page 623). Il fut ensuite modifié par d'autres, en particulier par Matthew Meselson et Charles Radding, de manière à rendre compte de nouvelles observations expérimentales. Le **modèle de Holliday** contient toutes les caractéristiques fondamentales contenues dans les autres modèles proposés pour les eucaryotes et les procaryotes. Le concept d'ADN hybride ou **hétéroduplex** présenté dans ce modèle exprime bien la conception actuelle du phénomène de crossing-over. La figure 20-4 explique le modèle de Holliday dans sa totalité. Il est basé sur la formation d'une connexion ou **pont** entre deux chromatides, le glissement de cette connexion par migration le long de la molécule hétéroduplex, appelé **migration de branchement,** et la coupure de l'intermédiaire ainsi formé en l'un ou l'autre point, de manière à produire différents types de molécules recombinantes. Passons en revue le modèle présenté dans la figure 20-4.

Coupures enzymatiques et création de molécules d'ADN hétéroduplex

En 20-4a, nous voyons deux doubles hélices homologues alignées ; remarquez que la molécule inférieure a subi une rotation de manière à ce que les polarités des brins intérieurs et extérieurs des deux doubles hélices soient les mêmes. En 20-4b, une nucléase a introduit une coupure dans les brins 5'-3' de chacune des deux molécules. En 20-4c, les extrémités libres ont quitté leur localisation d'origine et se sont associées au brin complémentaire de l'autre double hélice par des liaisons hydrogène. La structure représentée en 20-4d résulte de réactions de ligature. Elle est partiellement en hétéroduplex et constitue un intermédiaire crucial dans la recombinaison. Elle a été baptisée **structure de Holliday.**

La migration de branchement

La structure de Holliday contient un pont ou branchement qui peut se déplacer le long de la molécule hétéroduplex (figures 20-4d et 20-4e). Ce phénomène de migration de branchement est l'une des caractéristiques du modèle de Holliday. La figure 20-5 montre

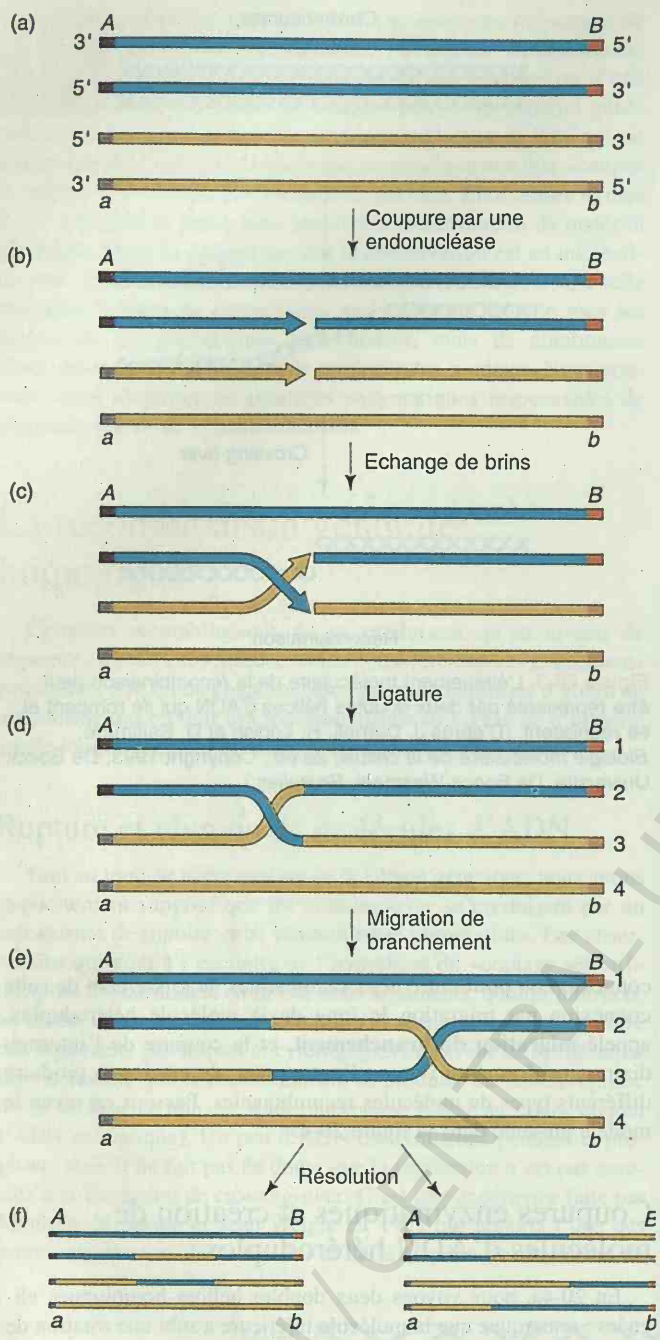


Figure 20-4. Un mécanisme-type de recombinaison. (a) Deux molécules d'ADN en double hélice. (b) Une hélice a subi une rotation de manière à ce que le brin supérieur de la molécule du bas ait la même polarité que le brin inférieur de la molécule du haut. (c) Les deux brins parallèles ou les deux brins anti-parallèles sont coupés. (d) Les extrémités libres se désolidarisent du brin auquel elles étaient liées par des ponts hydrogène. (e) Les extrémités libres s'associent au brin de la double hélice homologue qui leur est complémentaire. (f) Une ligature produit des doubles hélices partiellement hétéroduplex. Cette structure correspond au modèle de Holliday. (g) Le point de branchement migre grâce au transfert progressif des deux brins impliqués dans le crossing-over. (Les figures 20-4 et 20-6 sont issues de H. Potter et D. Dressler, *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology,* 43, 1979, 970. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.)

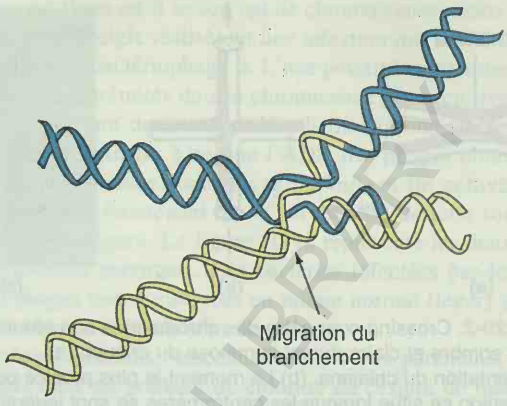


Figure 20-5. La migration de branchement, le mouvement du point d'échange entre des duplex d'ADN. (D'après T. Brooker, *Journal of Molecular Biology* 81, 1973, 1 ; dans J.D. Watson et al., *Molecular Biology of the Gene,* 4ème éd. Copyright © 1987 chez Benjamin Cummings.)

une vue plus réaliste de l'aspect que peut avoir cette structure au cours de la migration de branchement.

La résolution de la structure de Holliday

La structure de Holliday peut être coupée puis ligaturée soit au niveau des deux brins qui ont fait l'objet de l'échange (figure 20-4f, à gauche) soit au niveau des deux brins inchangés (figure 20-4f, à droite). Le premier mécanisme produit une paire de molécules semblables aux molécules parentales sauf dans une région centrale qui contient un brin provenant de chacun des parents. Si les parents portaient des allèles différents dans cette région, la molécule d'ADN recombinante sera génétiquement hétéroduplex. L'autre mécanisme de résolution produit deux duplex recombinants qui contiennent chacun une région d'ADN hétéroduplex.

La figure 20-6 illustre, de nouveau de façon schématique, la manière dont la structure de Holliday peut être manipulée pour produire les molécules recombinantes telles que nous nous attendons à les voir. La figure 20-6a reprend, dans une configuration plus étirée, la structure présentée dans la figure 20-4e. Observez ces deux figures le temps qu'il faut pour vous convaincre qu'elles représentent effectivement la même chose. Si nous effectuons maintenant une rotation de la partie inférieure de la molécule représentée en 20-6a (voir 20-6b), nous obtenons la structure représentée en 20-6c. Par une coupure enzymatique au niveau de deux brins seulement, cette dernière forme peut être convertie en deux doubles hélices indépendantes. Comme illustré en 20-6c, cette coupure peut se produire de deux manières différentes (sur le schéma, soit horizontalement soit verticalement, figure 20-6d). Les molécules obtenues peuvent être représentées de manière plus simple (figure 20-6e). Enfin une synthèse réparatrice produit les molécules recombinantes (figure 20-6f). Notez la différence entre ces molécules recombinantes ; les unes sont recombinées pour les marqueurs génétiques extérieurs, les autres ne le sont pas.

Les applications du modèle de Holliday aux croisements génétiques

Voyons maintenant comment le modèle décrit dans les figures 20-4, 20-5 et 20-6 explique les croisements génétiques. Considé-

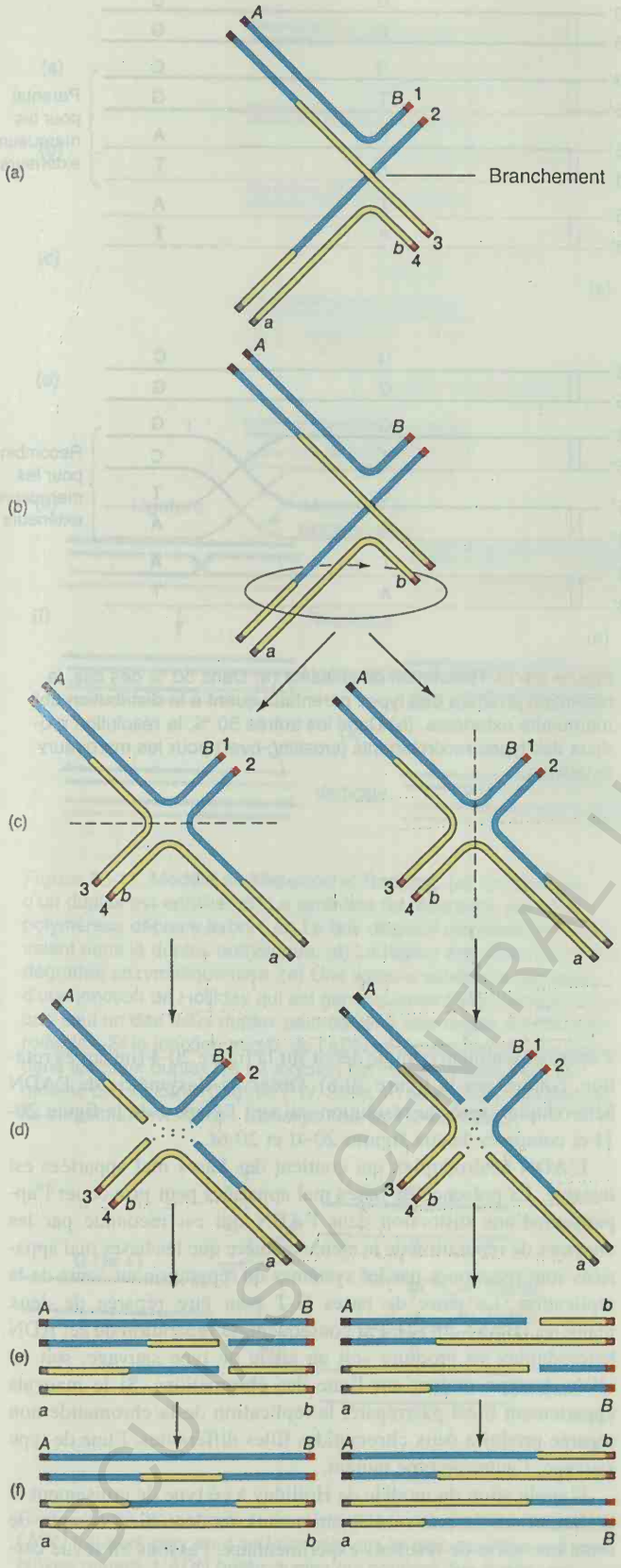


Figure 20-6. (a) Représentation plus étirée de la structure de Holliday. (b) Une rotation de la structure représentée en (a) peut donner la forme représentée en (c). (d) En fonction de la localisation des sites de coupure, la structure montrée en (c) peut se résoudre selon deux voies. Ceci produit les structures décrites en (d) qui peuvent être représentées comme en (e), et réparées pour donner les structures présentées en (f).

rons le croisement hypothétique + X *m*, dans lequel l'allèle + correspondrait à une paire de bases C-G et l'allèle *m* au même site ayant subi une mutation de transition vers une paire de bases T-A (figure 20-7). Un marqueur extérieur hypothétique est aussi représenté à l'extrémité droite de la molécule. Les quatre chromatides sont représentées sous la forme de quatre doubles hélices. Les flèches indiquent la polarité des brins (5' → 3'). Un site hypothétique de coupure fixe est également représenté (il pourrait être par exemple le site de reconnaissance d'une endonucléase, nous verrons bientôt pourquoi). Ce site fixe de coupure est le siège d'une rupture des liens phosphodiesters (figure 20-8) et les brins rompus se dégagent de leur fibre complémentaire sur une certaine distance. Les deux brins déroulés ont la même polarité (indiquée par les flèches). Ils peuvent donc être soudés par la ligase, chacun au point de rupture de l'autre (figure 20-9). Ceci fournit deux molécules hétéroduplex constituées de deux brins de couleur différente et qui contiennent deux paires de bases illégitimes (G-T et C-A). (Nous reviendrons sur ce point.) La structure de la figure 20-9 peut subir une rotation comme nous l'avions fait pour la structure de la figure 20-6c et donner une molécule plane.

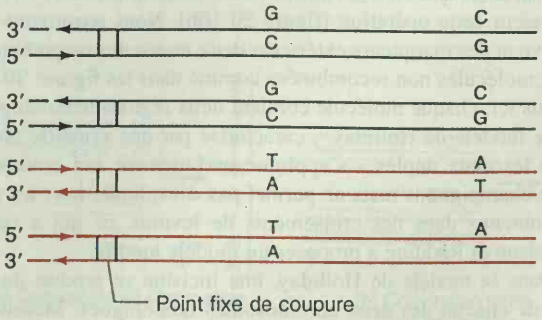


Figure 20-7. Sur cette figure et sur les suivantes, chaque série de deux traits représente une double hélice. Chaque double hélice correspond à une chromatide méiotique dans un croisement + × m. Les lignes noires correspondent à un parent, les lignes rouges au second parent. La figure décrit l'arrangement normal des quatre chromatides en synapsis, au cours de la prophase de la première division méiotique. Les flèches montrent les polarités opposées des brins d'ADN. Un point fixe de coupure qui pourrait être le site de reconnaissance par une nucléase, est également représenté.

BOU TAST / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

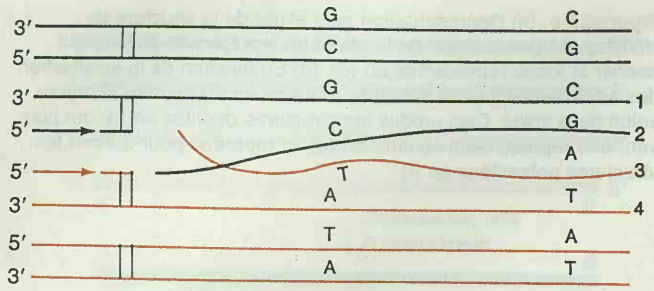


Figure 20-8. La coupure et le déroulement des brins correspondants. Les brins coupés se déroulent à partir du point de rupture en s'en éloignant. La ligase peut ensuite catalyser la liaison de chacun d'eux au point de rupture initial de l'autre.

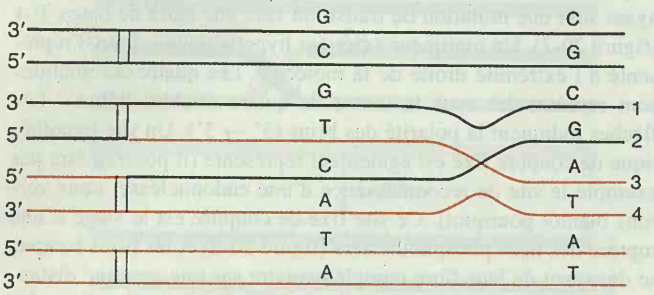


Figure 20-9. Formation de chiasma et d'une région en hétéroduplex qui s'étend entre le point de rupture et le point de branchement. L'ADN hétéroduplex contient des paires de bases mal appariées (GT et CA dans le cas représenté ici).

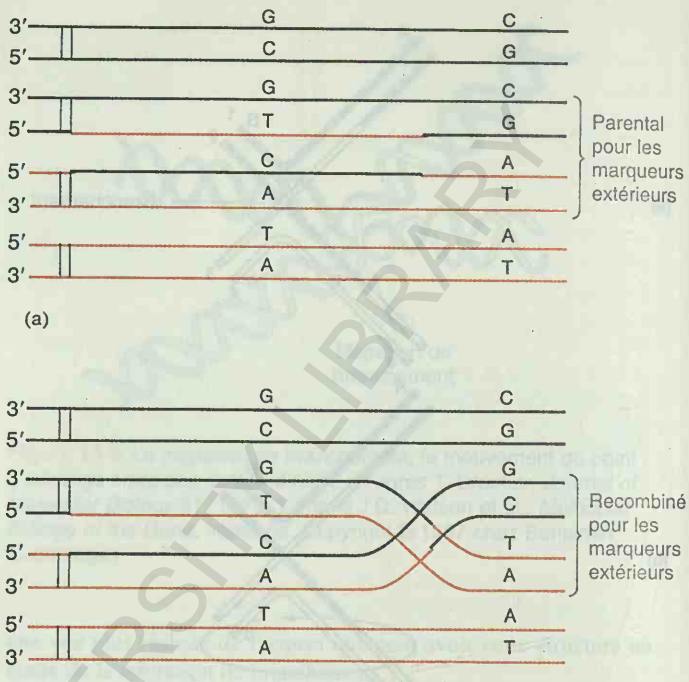


Figure 20-10. Résolution du chiasma (a) Dans 50 % des cas, la résolution produira des types parentaux quant à la distribution des marqueurs extérieurs. (b) Dans les autres 50 %, la résolution produira des types recombinants (crossing-over) pour les marqueurs extérieurs.

Une coupure au niveau de la jonction peut résoudre la structure en deux molécules recombinantes. Nous pouvons supposer que dans 50 % des cas les brins 2 et 3 sont «coupés et collés» (figure 20-10a) alors que dans les autres cas ce seraient les brins 1 et 4 qui subiraient cette opération (figure 20-10b). Nous retrouvons donc au niveau des marqueurs extérieurs deux molécules recombinées et deux molécules non recombinées comme dans les figures 20-6e et f, mais ici, chaque molécule contient deux régions hétéroduplex.

Le modèle de Holliday – caractérisé par une symétrie absolue entre les deux duplex - s'applique parfaitement aux croisements entre champignons mais ne permet pas d'expliquer tous les résultats obtenus dans des croisements de levures, ce qui a conduit Meselson et Radding à proposer un modèle modifié.

Dans le modèle de Holliday, une incision se produit dans un brin de chacun des deux chromosomes homologues. Meselson et Radding ont proposé un autre modèle (figure 20-11) dans lequel une seule incision d'un brin d'un des chromosomes (20-11a), suivie d'une synthèse d'ADN (20-11b), peut conduire à la formation d'une structure de Holliday. Après la coupure, le simple brin déplacé envahit le second duplex d'ADN (20-11c), ce qui produit une boucle qui est excisée et dégradée (20-11d). Une rotation autour du point de croisement des brins et une migration de branchement (20-11e) créent une région hétéroduplex dans chacun des chromosomes. La résolution de cette structure intermédiaire (20-11f) s'opère exactement comme décrit sur la figure 20-4 (ou, après rotation, comme sur la figure 20-6). Observez l'asymétrie de l'ADN hétéroduplex après la résolution qui suit l'étape f de la figure 20-11 et comparez-la aux figures 20-4f et 20-6f.

L'ADN hétéroduplex qui contient des bases mal appariées est instable. La présence de bases mal appariées peut provoquer l'apparition d'une distorsion dans l'ADN qui est reconnue par les enzymes de réparation de la même manière que les bases mal appariées sont reconnues par les systèmes de réparation au cours de la réplication. La paire de bases G-T peut être réparée de deux manières (figure 20-12). Par conséquent, la réparation de cet ADN hétéroduplex va produire soit un allèle de type sauvage, soit un allèle de type mutant sur l'une des chromatides. Si le mauvais appariement n'est pas réparé, la réplication de la chromatide non réparée produira deux chromatides filles différentes, l'une de type sauvage, l'autre de type mutant.

L'application du modèle de Holliday à ce type de croisement et la formation de mauvais appariements rendent bien compte de toute une série de résultats expérimentaux. Passons en revue certains d'entre eux.

1 : *Conversion de chromatide et conversion de demi-chromatide.* Nombre des informations que nous avons sur la recombinaison chez les eucaryotes proviennent de l'étude des champignons. La

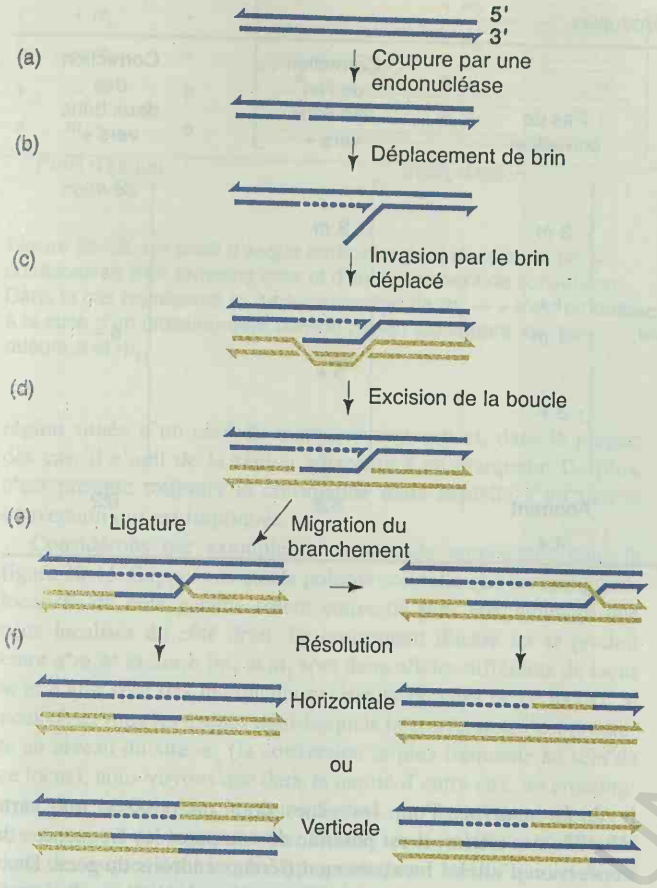


Figure 20-11. Modèle de Meselson et Radding. (a) Un seul brin d'un duplex est entaillé. (b) La synthèse de réparation par l'ADN polymérase déplace le brin. (c) Le brin déplacé remplace son équivalent dans le duplex homologue. (d) La région extrudée du brin est dégradée enzymatiquement. (e) Une ligature achève la formation d'une jonction de Holliday qui est génétiquement asymétrique parce que seul un des deux duplex peut contenir une région d'ADN hétéroduplex. Si la jonction migre, de l'ADN hétéroduplex peut se former dans les deux duplex. (f) La jonction est clivée comme dans le modèle de Holliday. (D'après F.W. Stahl, «The Holliday junction on its thirtieth anniversary», *Genetics* 138, 241-246, 1994.)

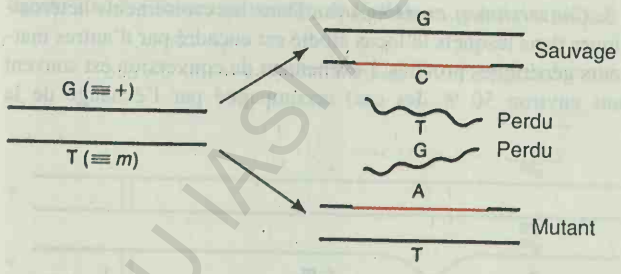


Figure 20-12. La correction de nucléotides mal appariés au sein de l'ADN hétéroduplex peut se faire soit vers le type sauvage soit vers le type mutant. L'ADN hétéroduplex qui contient des bases mal appariées est instable. Le mauvais appariement peut provoquer une distorsion de la double hélice, qui sera reconnue par un système de réparation de la même manière que sont reconnus les mauvais appariements générés au cours de la réplication de l'ADN (voir chapitre 19).

+	+	*m*	+	+	+	
+	+	*m*	+	+	+	
+	+	*m*	+	+	+	
+	+	*m*	+	*m*	*m*	
m	+	*m*	+	*m*	+	
m	+	*m*	*m*	*m*	*m*	
m	*m*	+	*m*	*m*	*m*	
m	*m*	+	*m*	*m*	*m*	
4:4	6:2	2:6	5:3	3:5	3:1:1:3	(*Note:* 3 : 1 : 1 : 3 = 4 : 4 aberrant.)
Normal	Conversion de chromatide		Conversion d'une demi-chromatide			

Figure 20-13. Rapports d'allèles exceptionnels observés lors de croisements du type + × *m* entre champignons. Ce sont les génotypes des asques qui sont représentés. Le fait de ne pas obtenir un rapport mendélien 4:4 signifie que certains allèles du croisement ont été convertis en l'allèle opposé. Tout se passe comme si, dans certains asques, l'entièreté de la chromatide avait été convertie (ce qui se traduit par un rapport 6:2 ou 2:6). Dans d'autres asques, il semble qu'une partie seulement des allèles aient été convertis (ce qui se traduit par les rapports 5:3, 3:5 ou 1:3, 3:1).

raison en est qu'ils forment des asques qui se prêtent remarquablement bien à l'analyse. Les quatre produits d'une méiose peuvent être récupérés et examinés de telle sorte qu'il est possible de retracer les événements qui se sont produits à chaque méiose individuelle et de faire le bilan de l'information génétique perdue ou acquise. L'asque est un système fermé qui renferme ses propres contrôles internes.

Dans certains asques on détecte des rapports non-mendéliens. Mendel avait prédit des rapports de ségrégation 4:4 pour tous les croisements monohybrides. En fait, on trouve parfois d'autres rapports (0,1 à 1 % des asques analysés selon les espèces de champignons, mais jusqu'à 4% chez la levure). La figure 20-13 montre les rapports aberrants observés le plus fréquemment. Tout se passe comme si, au cours du croisement, certains gènes avaient été «convertis» en l'allèle opposé (figure 20-14). C'est pour cette raison que ce processus a été baptisé **conversion génique** ; il ne peut se produire que dans les situations d'hétérozygotie où deux allèles différents d'un même gène entrent en jeu. Dans certains asques (qui présentent des rapports 6:2 ou 2:6), il semble que la totalité de la chromatide ait été convertie. C'est ce que l'on appelle la **conversion de chromatide.** Dans d'autres asques, le rapport est de

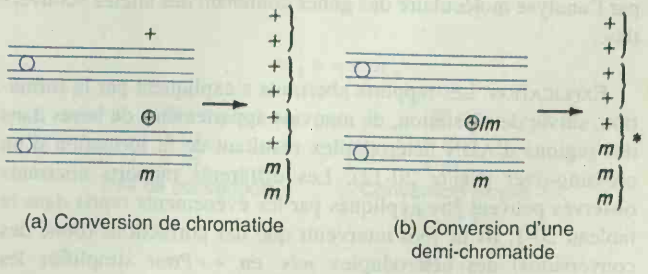


Figure 20-14. La conversion génique peut être inférée du profil de distribution des allèles dans les asques. (a) Lors de la conversion d'une chromatide entière, tout se passe comme si l'allèle d'une paire de chromatides s'était converti en celui de l'autre paire de chromatides. Sur la figure, l'allèle converti est marqué par le signe +. Une paire de spores présente un génotype opposé à celui que l'on attend d'une ségrégation mendélienne. (b) Lors de la conversion d'une demi-chromatide, une spore (*) présente le phénotype d'origine, une autre présente un génotype converti.

PCU IASTICE – UNIVERSITY LIBRARY

Tableau 20-1. Correction de l'une ou des deux molécules d'ADN hétéroduplex

Brins d'ADN au début de la méiose	Brins au stade de l'ADN hétéroduplex	Pas de correction	Correction de l'un des brins vers +	Correction des deux brins vers +
Deux chromosomes homologues	Quatre chromatides contenant chacune deux brins			
_m_ / _m_	_m_ / _m_	3 *m*	3 *m*	2 *m*
_m_ / _m_	_m_ / _+_ (Brins impliqués dans le crossing-over)	1 +	5 +	6 +
		1 *m*		
_+_ / _+_	_m_ / _+_	3 +		
_+_ / _+_	_+_ / _+_			
		Aberrant 4:4	5:3	6:2

3:5 ou de 5:3 comme si une moitié seulement de la chromatide avait été convertie. On parle alors de **conversion de demi-chromatide.** Dans ce dernier cas, les deux membres d'une paire de spores ont des génotypes différents. Rappelons que chaque paire de spores est le produit d'une mitose qui suit la méiose. La conversion d'une demi-chromatide implique donc qu'à la fin de la méiose, une double hélice d'ADN porte l'information pour deux allèles différents, c'est-à-dire qu'il y a un défaut de complémentarité. A la division mitotique suivante les deux fibres ségrègent séparément vers deux noyaux différents.

Notons encore que les autres allèles hétérozygotes, localisés ailleurs sur les chromatides, ségrègent dans un rapport 4:4 normal. Donc les rapports aberrants ne résultent pas d'artefacts. Le mécanisme de la conversion est directionnel et ne peut pas être dû à la mutagénèse. De plus l'allèle modifié l'est toujours en l'autre allèle impliqué dans le croisement. Cette spécificité a été confirmée par l'analyse moléculaire des gènes contenant des allèles «convertis».

EXPLICATION. Les rapports aberrants s'expliquent par la formation, suivie de réparation, de mauvais appariements de bases dans des régions d'ADN hétéroduplex résultant de la formation d'un crossing-over (figure 20-12). Les différents rapports aberrants observés peuvent être expliqués par les événements repris dans le tableau 20-1. Ils ne font intervenir que des corrections (donc des conversions) des hétéroduplex *m*/+ en +. Pour simplifier les choses, les symboles *m* et + ont ici remplacé les nucléotides utilisés dans les figures 20-7 à 20-10. Les mêmes rapports peuvent être obtenus par la correction de l'ADN hétéroduplex *m*/+ en *m*. Rappelons que la recherche d'une explication du phénomène de conversion génique et de son association avec le crossing-over a été à l'origine de l'élaboration du modèle de Holliday.

2. *La polarité.* Pour les gènes dont on possède une carte détaillée des allèles, il est possible de comparer les fréquences de conversion d'allèles localisés en différents endroits du gène. Dans la presque totalité des cas, les allèles situés près de l'une des extrémités du gène présentent une fréquence de conversion plus élevée que ceux qui sont localisés plus loin de cette extrémité. En d'autres termes, il existe une **polarité** de la fréquence de conversion le long du gène (figure 20-15).

EXPLICATION. La polarité s'explique par le fait qu'un site sera inclus d'autant plus fréquemment dans un ADN hétéroduplex qu'il est plus proche d'un point fixe de coupure. La figure 20-10 montre bien que la région d'ADN en hétéroduplex est comprise entre le point de coupure et le branchement.

3. *Conversion et crossing-over.* Dans les croisements hétéroalléliques dans lesquels le locus étudié est encadré par d'autres marqueurs génétiques proches, l'événement de conversion est souvent (dans environ 50 % des cas) accompagné par l'échange de la

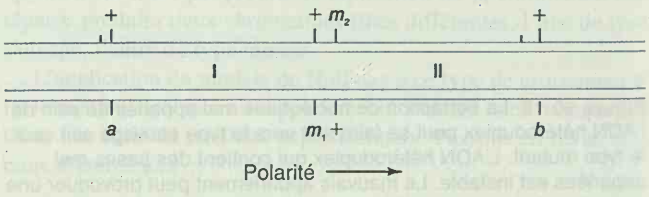


Figure 20-15. Diagramme des chromatides intervenant dans un croisement. La flèche indique la direction dans laquelle le gradient de la fréquence de conversion décroît au sein du gène *m*.

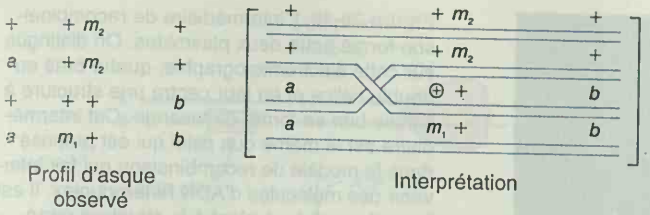


Figure 20-16. Un profil d'asque particulier peut s'expliquer par la combinaison d'un crossing-over et d'un événement de conversion. Dans le cas représenté ici, une conversion de $m_1 \rightarrow +$ s'est produite à la suite d'un crossing-over dans la région qui sépare les marqueurs *a* et m_1.

région située d'un côté du marqueur converti et, dans la plupart des cas, il s'agit de la région adjacente à ce marqueur. De plus, c'est presque toujours la chromatide dans laquelle a eu lieu la conversion qui est impliquée.

Considérons par exemple la chromatide représentée dans la figure 20-15. Supposons que la polarité soit telle que les marqueurs localisés du côté gauche soient convertis plus fréquemment que ceux localisés du côté droit. Le croisement illustré ici se produit entre $a^+m_2b^+$ et am_1b (m_2 et m_1 sont deux allèles différents du locus *m* et *a* et *b* sont des marqueurs extérieurs proches de ce locus). Si nous observons les asques dans lesquels la conversion s'est produite au niveau du site m_1 (la conversion la plus fréquente au sein de ce locus), nous voyons que dans la moitié d'entre eux, un crossing-over s'est produit dans la région I, alors que dans l'autre moitié, il n'y a pas eu de crossing-over. De tels événements sont détectés dans des asques dont le génotype correspond à celui qui est décrit dans la figure 20-16 et qui peut être le résultat d'une conversion de $m_1 \rightarrow +$, accompagnée d'un crossing-over dans la région I. Voyez-vous comment l'on pourrait faire la distinction entre les génotypes m_1+, $+m_2$ et m_1m_2 s'il s'agissait d'un locus contrôlant une fonction nutritionnelle (par exemple la synthèse de l'arginine) ?

EXPLICATION. L'association qui se produit, dans la moitié des cas, entre un crossing-over et la conversion génique peut s'expliquer par l'existence de deux modes de résolution, tout aussi probables l'un que l'autre, au point d'échange entre les deux chromatides. L'asque que nous avions utilisé pour illustrer le point 3 (figure 20-16), peut être expliqué comme nous le faisons dans la figure 20-17. (Toute conversion de l'allèle m_2 peut s'expliquer en considérant que de l'ADN hétéroduplex peut provenir d'un point de rupture situé plus loin vers la droite.)

4. *La co-conversion.* Dans certains asques, un événement de conversion unique semble avoir inclus simultanément plusieurs sites. Dans un croisement hétéroallélique, un événement de ce type est appelé **co-conversion** (figure 20-18). La fréquence de co-conversion est d'autant plus élevée que les allèles sont plus rapprochés.

EXPLICATION. La co-conversion peut s'expliquer par la présence des deux allèles dans la région d'ADN hétéroduplex et par l'excision simultanée des deux sites lors de la réparation. Cette double excision mène évidemment à la conversion des deux sites vers le même type parental.

Message Le phénomène de conversion génique fournit une série d'indices qui amènent à concevoir un modèle faisant intervenir une région d'ADN hétéroduplex pour expliquer le mécanisme du crossing-over. Les rapports alléliques observés dans les croisements sont généralement mendéliens (1:1) parce que le point précis d'échange entre chromatides ne se situe que très rarement au niveau du locus hétérozygote. En outre, rappelons que les asques où se produit un événement de conversion au niveau d'un locus hétérozygote sont relativement rares (environ 1 %).

Visualisation des intermédiaires de la recombinaison

Plusieurs étapes prédites par le modèle de Holliday ont été démontrées par des expériences faites in vivo ou in vitro, par exemple les coupures, le déplacement de brin, la migration de branchement, la synthèse de réparation et la ligature. H. Potter et D. Dressler ont montré que des structures du type prévu par le modèle peuvent être détectées parmi des ADN de phages ou de plasmides en recombinaison. La figure 20-19 montre une électromicrographie d'une molécule recombinante. Elle est formellement semblable aux paires centrales d'ADN en double hélice représentées dans la figure 20-9 dont deux des bras auraient subi une rotation de manière à former le «losange» central à simple brin de la figure 20-6c. Les régions monocaténaires correspondent aux «coudes» de la figure 20-6c.

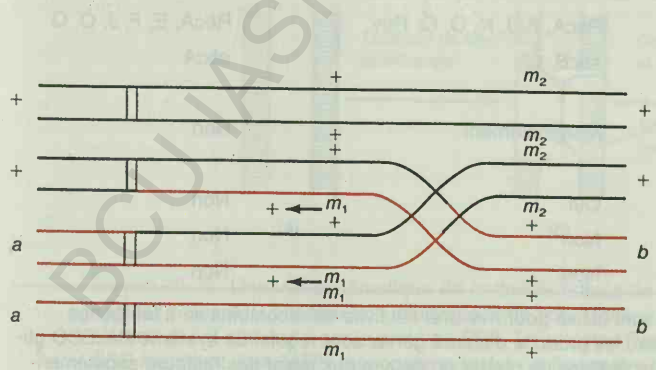


Figure 20-17. Utilisation du modèle de l'ADN hétéroduplex pour expliquer la formation de l'asque de la figure 20-16. Les flèches montrent la direction dans laquelle la correction de l'ADN s'est faite.

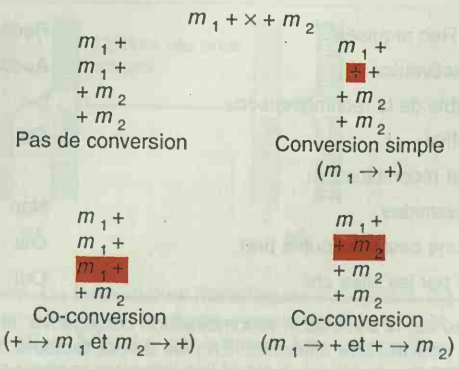


Figure 20-18. Quelques exemples de profils d'asques résultant de conversions simples ou de co-conversions.

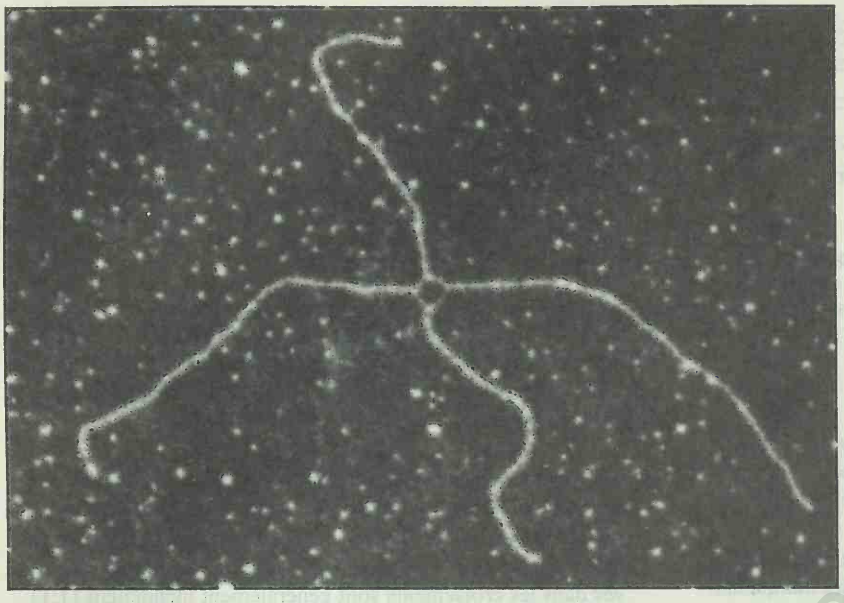


Figure 20-19. L'intermédiaire de recombinaison formé entre deux plasmides. On distingue sur cette électromicrographie, quatre bras en double hélice et en leur centre une structure à simple brin en forme de losange. Cet intermédiaire est le même que celui qui est proposé dans le modèle de recombinaison qui fait intervenir des molécules d'ADN hétéroduplex. Il est formellement équivalent à la structure représentée dans la figure 20-6c. (Photographie fournie par H. Potter et D. Dressler.)

Les mécanismes enzymatiques de la recombinaison

L'isolement de mutants déficients dans l'une ou l'autre étape de la recombinaison a permis d'obtenir de nombreuses informations sur les mécanismes enzymatiques de ce processus. Chez *E.coli,* les produits de plusieurs gènes impliqués dans la recombinaison générale *(recA, recB, recC* et *recD)* ont été bien caractérisés. Il en est de même pour un gène qui code pour une protéine qui se fixe à l'ADN simple brin (SSB). Les mutants de chacun de ces gènes présentent un niveau de recombinaison générale réduit. Trois systèmes distincts ont été identifiés. En plus du système principal RecBCD, deux systèmes moins importants, RecE et RecF, sont activés dans certaines circonstances. Les trois systèmes utilisent la protéine RecA. Le tableau 20-2 résume ce que l'on sait de ces trois systèmes.

Production de l'ADN simple brin

L'une des premières étapes de la recombinaison consiste sans doute en la coupure et le déroulement d'un ADN à double brin grâce à l'intervention d'une protéine multimérique codée par les gènes *recB, recC* et *recD.* Ce complexe combine les activités hélicase et nucléase. La figure 20-20 montre comment le complexe déroule l'ADN et produit des brins séparés en se déplaçant moyennant l'hydrolyse d'ATP. L'activité nucléase reconnaît un motif de 8 pb :

Tableau 20-2. Principaux systèmes de recombinaison chez *E. coli*

Propriétés	Système		
	RecBCD	RecF	RecE
Protéines Rec requises*	RecA, B, C, D	RecA, F, J, N, O, Q; Ruv	RecA, E, F, J, O, Q
Mutation activatrice	Aucune	*sbcB, C*	*sbcA*
Responsable de la recombinaison conjugative	Oui	Marginalement	Non
Favorise la recombinaison entre plasmides	Non	Oui	Non
Requiert une cassure double brin	Oui	Non	Non
Activation par les sites *chi*	Oui	Non	Non

*Déterminé sur la base de la recombinaison conjugative; si d'autres tests sont utilisé pour mesurer l'activité de recombinaison, les gènes impliqués peuvent être différents. En plus de ces facteurs de recombinaison, les produits d'autres gènes sont requis. Le système RecBCD utilise aussi SSB, une gyrase, pol I et la ligase ; les autres systèmes sont susceptibles de mettre en oeuvre eux aussi des facteurs supplémentaires similaires.

SOURCE : A. Kornberg et T. Baker, *DNA Replication,* 2è éd., Copyright 1992 chez W.H. Freeman and Company. D'après G.R. Smith, *Cell* 58, 1989, 807.

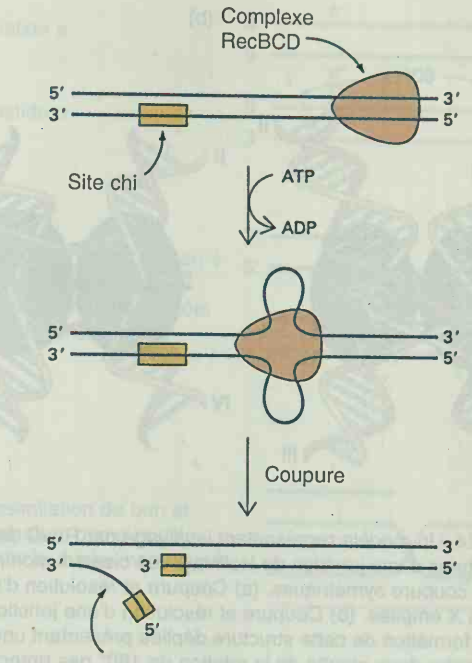


Figure 20-20. Modèle du mécanisme de production d'ADN simple brin par le complexe RecBCD (en rose) qui comporte une hélicase qui se déplace avec hydrolyse d'ATP et une nucléase. La progression du complexe provoque la formation de deux boucles d'ADN simple brin. L'activité nucléase coupe un des brins quand elle rencontre une séquence chi (en jaune). Une région d'ADN simple brin dotée d'une extrémité libre est créée. La recombinaison peut commencer. (D'après A. Taylor et G.R. Smith, *Cell* 22, 447, 1980; extrait de L. Stryer, *Biochemistry*, 4è éd. Copyright © 1995 chez W.H. Freeman and Company.)

5' GCTGCTGG 3'

appelé **site chi**, qui se présente tous les 64 kpb en moyenne. Au fur et à mesure que le complexe déroule l'ADN, les régions simple brin ainsi formées peuvent servir à initier la recombinaison (voir plus loin). La protéine SSB qui est aussi nécessaire à la réplication de l'ADN (voir chapitre 11) peut se lier aux régions monocaténaires ainsi formées et les stabiliser.

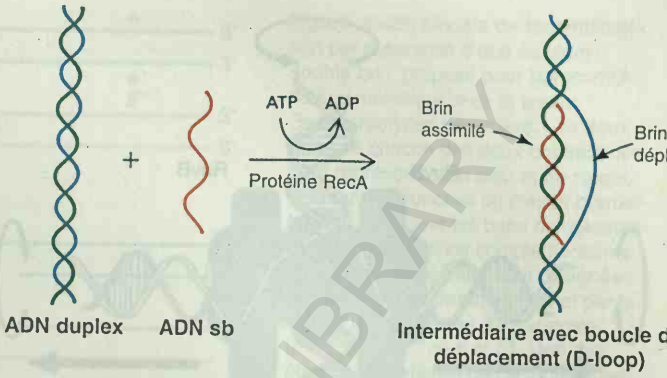


Figure 20-21. La protéine RecA catalyse l'appariement d'une molécule d'ADN simple brin avec le brin complémentaire d'un duplex (assimilation). La structure qui en résulte est appelée «D-loop». L'hydrolyse d'ATP permet à RecA de se libérer de l'ADN. (Extrait de L. Stryer, *Biochemistry*, 4è éd. Copyright © 1995 chez W.H. Freeman and Company.)

La protéine RecA effectue l'échange entre les régions d'ADN simple brin

La protéine codée par le gène *recA*, qui joue aussi un rôle important lors de l'induction du système de réparation SOS (voir les chapitres 18 et 20), se lie à l'ADN monocaténaire sur toute sa longueur et forme un filament de nucléoprotéine. RecA catalyse l'invasion d'un ADN bicaténaire par l'ADN simple brin de manière à en déplacer le brin équivalent. Cette réaction nécessite la présence d'ATP (figure 20-21). Le brin déplacé forme ce que l'on appelle une **boucle de déplacement** (en anglais, **D-loop**). La figure 20-22 montre comment ce processus conduit à la formation d'une jonction de Holliday.

Migration du point de branchement

Le déplacement d'une jonction de Holliday (ou déplacement de point de branchement, voir par exemple les figures 20-4e et 20-5) augmente la taille de la région d'ADN hétéroduplex. Les protéines RuvA et RuvB catalysent la migration du branchement en consommant de l'ATP. La microscopie électronique montre que RuvA est fixée au point d'échange et qu'elle est flanquée de deux anneaux hexamériques de RuvB. Un mécanisme d'action possible de ces protéines est représenté dans la figure 20-23.

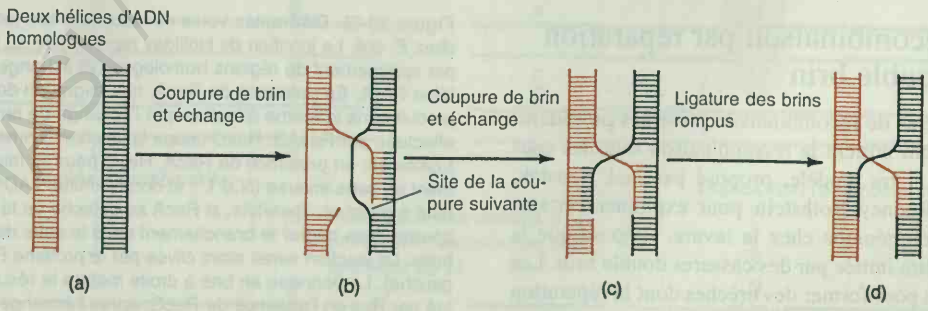


Figure 20-22. Une vue schématique de certaines étapes de la recombinaison. (a) Deux duplex homologues s'apparient. (b) La nucléase RecBCD effectue une incision simple brin. L'hélice est partiellement déroulée et la région monocaténaire produite s'étend et est stabilisée par la protéine SSB. La protéine RecA catalyse l'invasion du duplex par le simple brin. La protéine SSB maintient libre l'ADN monocaténaire. La flèche montre la position de la coupure suivante. (c) Après avoir été coupé par la nucléase RecBCD, le brin libre de la seconde hélice peut s'apparier avec le premier duplex. (d) L'ADN ligase peut ligaturer cette structure. (e) Lorsqu'elle a subi une rotation de 180°, cette structure est équivalente à celle présentée dans les figures 20-6c et 20-19. (D'après B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*. Copyright © 1983 chez Garland Publishing.)

RCU IAS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

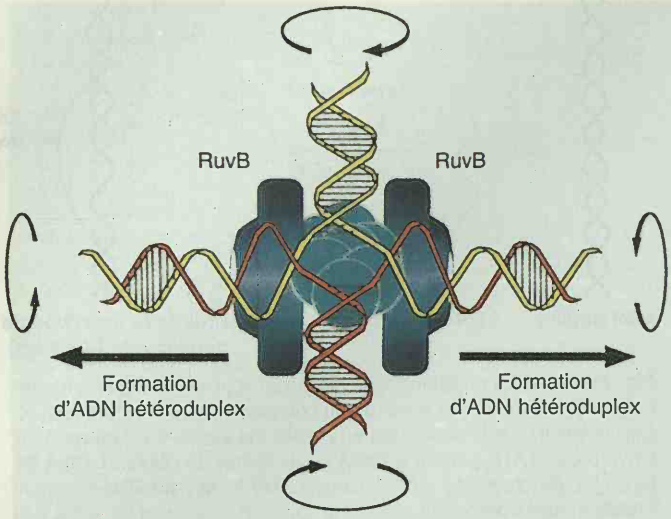


Figure 20-23. Un modèle pour la migration de branchement effectuée par RuvAB. Les sphères bleues représentent la protéine RuvA qui se fixe au point de branchement dans le complexe structure de Holliday–RuvAB. RuvA est flanquée par deux hexamères de RuvB organisés en anneaux. Les deux hexamères de RuvB ont des orientations opposées et provoquent la migration du branchement en faisant glisser l'ADN dans l'anneau. (Extrait de Carol A. Parsons, Andrzej Stasiak, Richard J. Bennett et Stephen C. West, «Structure of a Multisubunit Complex that Promotes DNA Branch Migration», *Nature* 374, 377. 1995.)

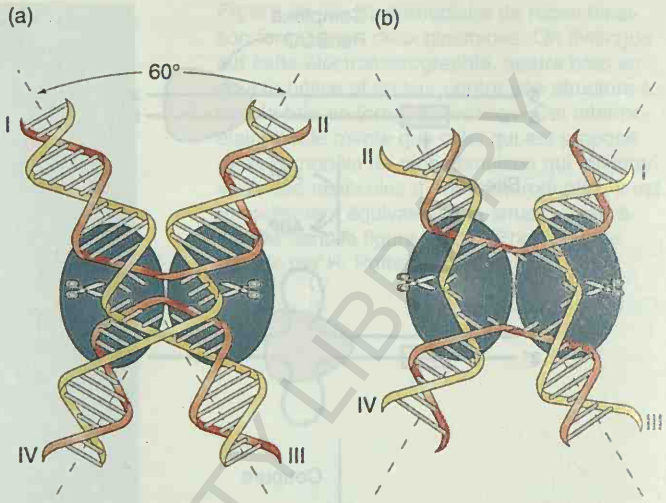


Figure 20-24. Un modèle représentant le clivage par RuvC de deux des quatre brins d'une jonction de Holliday. Les ciseaux montrent les sites de coupure symétriques. (a) Coupure et résolution d'une structure en X empilée. (b) Coupure et résolution d'une jonction dépliée. La formation de cette structure dépliée présentant une symétrie d'ordre deux résulte de la rotation de 180° des branches I et II de la structure montrée en (a). (Extrait de Richard J. Bennett and Stephen C. West, «RuvC Protein Resolves Holliday Junctions via Cleavage of the Continuous (Noncrossover) Strands», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 5639, 1995.)

Clivage des jonctions de Holliday

Plusieurs voies enzymatiques impliquées dans le clivage du point d'échange des brins des structures de Holliday ont été identifiées. Ces réactions produisent deux duplex d'ADN. RuvC est une endonucléase qui clive les jonctions de Holliday par coupure symétrique des deux brins d'ADN continus (non croisés) (figure 20-24). Les protéines RecG et Rus participent à d'autres voies de clivage. Les différentes réactions sont résumées dans la figure 20-25.

Le modèle de recombinaison par réparation d'une cassure double brin

Dans les deux modèles de recombinaison présentés précédemment, les événements qui initient la recombinaison sont des coupures simple brin. Un autre modèle, proposé par Jack Szostak, Terry Orr-Weaver et Rodney Rothstein pour expliquer certains aspects de la conversion génique chez la levure, suppose que la recombinaison puisse être initiée par des cassures double brin. Les cassures sont agrandies pour former des brèches dont la réparation produit la conversion génique. Le modèle est présenté dans la figure 20-26. Remarquez que la réparation des brèches double brin s'effectue en deux étapes de réparation de brèches simple brin et que l'ADN flanquant la zone de réparation contient des régions hétéroduplex. La structure intermédiaire contient deux jonctions de Holliday qui peuvent être clivées de plusieurs façons. Bien que ce modèle puisse expliquer la conversion génique sans réparation de défauts d'appariement dans l'ADN hétéroduplex, cette répara-

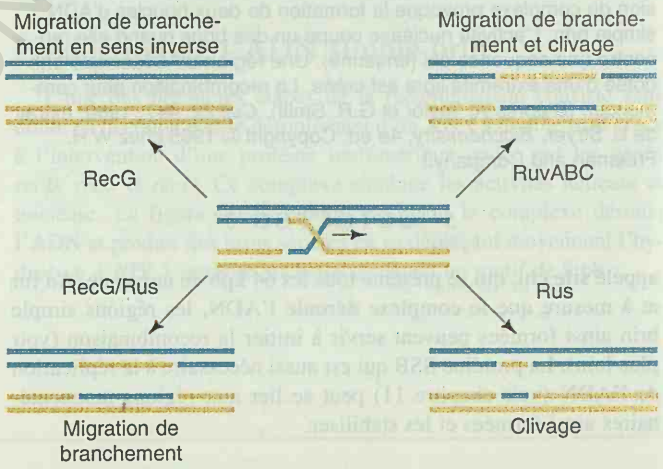


Figure 20-25. Différentes voies de résolution des jonctions de Holliday chez *E. coli*. La jonction de Holliday représentée au centre fut formée par appariement de régions homologues et échange de brins par la protéine RecA. En présence de RecA, une migration de branchement se produit dans la même direction que l'échange de brins. La migration est effectuée par RuvAB. RuvC coupe la jonction (en haut à droite). Egalement en présence de RecA, RecG pourrait faire migrer le branchement en sens inverse (N.d.T. : et donc éliminer l'ADN hétéroduplex) (en haut à gauche). Toutefois, si RecA se détache de la jonction, RecG pourrait faire migrer le branchement dans le sens de l'échange des brins. La jonction serait alors clivée par la protéine Rus (en bas à gauche). Le panneau en bas à droite montre le résultat du clivage effectué par Rus en l'absence de RecG, après l'échange de brins et la migration de branchement effectués par RecA. (N.d.T. : Les produits de réaction montrés ici ne présentent pas de recombinaison des régions qui flanquent la jonction et correspondent à un des modes possibles de clivage de la jonction. L'autre mode de clivage peut aussi se produire, ainsi que le précisent les auteurs de l'article dont est tirée la figure.) (Extrait de Gary Sharples, Sau Chan, Akeel Mahdi, Matthew Whitby and Robert Lloyd, «Processing of Intermediates in Recombinantion and DNA Repair : Identification of a New Endonuclease That Specifically Cleaves Holliday Junctions», *EMBO Journal*, 13 (24), 6140, 1994.)

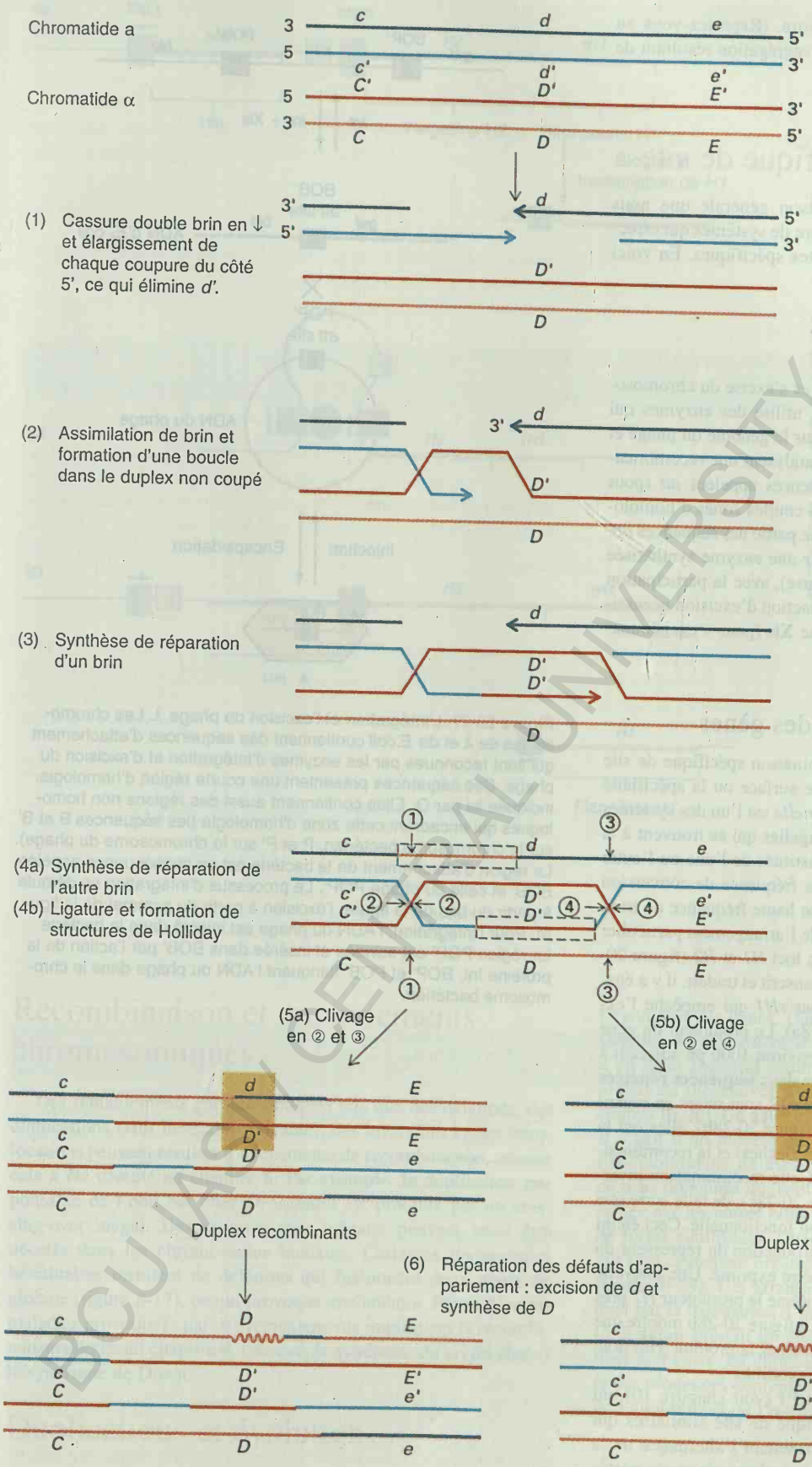


Figure 20-26. Modèle de recombinaison par réparation d'une cassure double brin, proposé pour la recombinaison méiotique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les deux brins de chacun des deux chromatides sont représentés en bleu et en rouge, les couleurs foncées ou claires permettant de distinguer les brins complémentaires. Les positions complémentaires d'un allèle d'une paire sont désignées respectivement par une lettre et par la même lettre affectée d'un «prime» (p.ex. : *C* et *C'* ou *c* et *c'*). Une des étapes essentielles de ce modèle est montrée en (3) et en (4) avec la formation d'une structure de Holliday comportant deux jonctions. Les traits noirs interrompus entourent les régions qui ont fait l'objet d'une synthèse de réparation. Deux résolutions différentes de cette structure produisent les duplex recombinants ou non recombinants montrés en (5a) et (5b). Les encadrés jaunes indiquent les régions hétéroduplex contenant des défauts d'appariement au niveau des allèles *d* et *D'*. La réparation des appariements défectueux va «convertir» *d'* en *D*. (Reportez-vous au tableau 20-1 pour les profils de ségrégation produits par réparation de mauvais appariements.) (Extrait de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3rd ed. Copyright © chez Scientific American Books.)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY

tion est en fait très fréquente chez la levure. (Reportez-vous au tableau 20-1 pour y trouver les profils de ségrégation résultant de la réparation d'hétéroduplex.)

La recombinaison spécifique de site

En plus des systèmes de recombinaison générale que nous venons de décrire, il existe un grand nombre de systèmes qui effectuent une recombinaison au niveau de sites spécifiques. En voici quelques exemples.

L'intégration du phage λ

Le bactériophage λ (lambda) s'intègre et s'excise du chromosome de sa bactérie hôte. Pour ce faire, il utilise des enzymes qui reconnaissent des séquences spécifiques sur le génome du phage et sur le chromosome de la bactérie et qui catalysent une recombinaison entre ces deux séquences. Ces séquences appelées *att* (pour «attachement») ne contiennent que de très courtes zones d'homologie (figure 20-27) qui ne constituent qu'une partie des séquences *att*. La réaction d'intégration est catalysée par une enzyme synthétisée par le phage, la protéine **Int** (pour intégrase), avec la participation d'une protéine bactérienne, alors que la réaction d'excision nécessite en plus de ces deux protéines, l'enzyme **Xis** (pour « excisionnase »), synthétisée elle aussi par le phage.

Le contrôle de l'expression des gènes

Plusieurs génomes utilisent la recombinaison spécifique de site pour contrôler la synthèse d'antigènes de surface ou la spécificité d'hôte. La variation de phase chez *Salmonella* est l'un des systèmes de ce type les mieux caractérisés. Les flagelles qui se trouvent à la surface de ces bactéries peuvent être constitués de l'une ou l'autre de deux protéines appelées H1 et H2. La fréquence de conversion entre l'un et l'autre type est de 10^{-3}. Cette haute fréquence de transition d'une «phase» vers l'autre résulte de l'arrangement particulier des gènes qui contrôlent l'expression des loci *H1* et *H2* (figure 20-28). Lorsque le gène *H2* est activement transcrit et traduit, il y a également synthèse d'un répresseur codé par *rH1* qui empêche l'expression du gène non lié *H1* (figure 20-28a). Le promoteur du gène *H2* se trouve sur un segment d'ADN d'environ 1000 pb adjacent à l'opérateur *H2*. Ce segment est flanqué de deux **séquences répétées inversées** de 14 pb (**IR**). Lorsque les deux IR sont mises en regard par un bouclage de l'ADN intervenant (figure 20-28b), elles ont la même orientation (comme le montrent les flèches) et la recombinaison homologue entre elles est possible. Cette recombinaison inverse le segment d'ADN intervenant (figure 20-28c), de telle sorte que le promoteur *H2* est éloigné de sa position fonctionnelle. Ceci éteint l'expression du gène *H2*, mais aussi la production du répresseur du gène *H1*. Le gène *H1* non lié peut alors être exprimé. Une nouvelle inversion du segment de 1000 pb repositionne le promoteur *H2* près de son gène qui est à nouveau exprimé. La figure 20-28b montre que la recombinaison entre les IR est effectuée par la protéine Hin dont le gène se trouve aussi dans le segment invertible.

Les phages *Mu* (voir chapitre 21) et P1 (voir chapitre 10) ont des systèmes de recombinaison spécifique de site similaires qui contrôlent leur spécificité d'hôte et permettent l'alternance de la synthèse de deux protéines de surface. Les gènes *gin* et *cin* portés respectivement par *Mu* et P1 sont étroitement apparentés au gène *hin* de *Salmonella*.

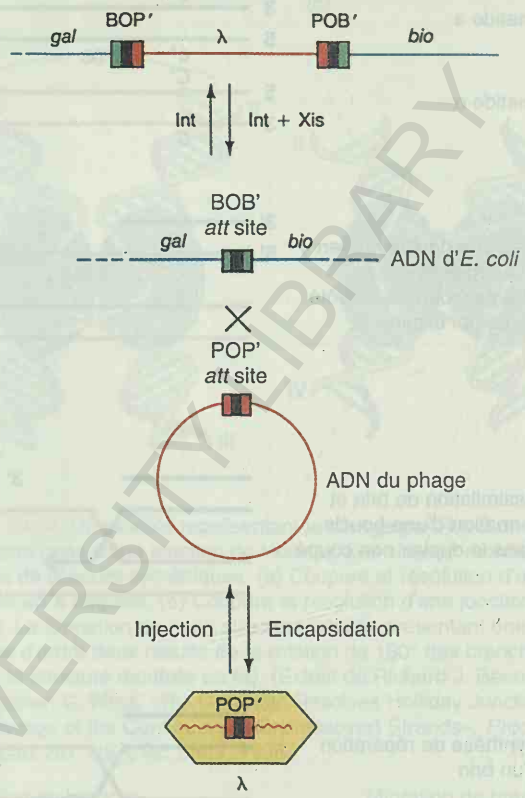


Figure 20-27. L'intégration et l'excision du phage λ. Les chromosomes de λ et de *E.coli* contiennent des séquences d'attachement qui sont reconnues par les enzymes d'intégration et d'excision du phage. Ces séquences présentent une courte région d'homologie, indiquée ici par O. Elles contiennent aussi des régions non homologues qui encadrent cette zone d'homologie (les séquences B et B' sur le chromosome bactérien, P et P' sur le chromosome du phage). La région d'attachement de la bactérie est en conséquence appelée BOB' et celle du phage POP'. Le processus d'intégration se déroule à partir du bas de la figure; l'excision à partir du sommet de la figure. Pour l'intégration, l'ADN du phage est injecté dans la bactérie. La région POP' est scindée et insérée dans BOB' par l'action de la protéine Int. BOP' et POB' flanquent l'ADN du phage dans le chromosome bactérien.

UNIVERSITY LIBRARY

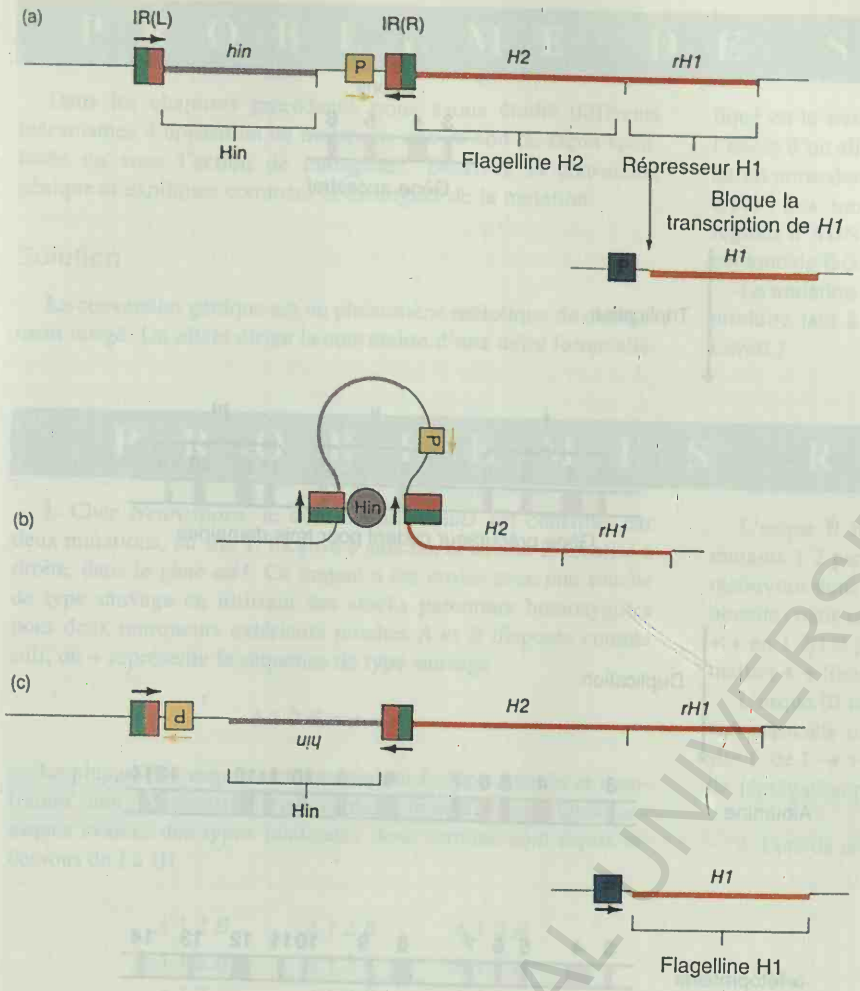


Figure 20-28. Un réarrangement génétique contrôle la variation de phase du flagelle de *Salmonella*. L'opéron *H2* est couplé ou découplé d'une région promoteur par l'inversion d'un segment d'environ 1000 paires de bases qui lui est adjacent. (b) Lorsque le promoteur est couplé à l'opéron H2, la flagelline H2 est synthétisée ainsi que le produit du gène *rHI* qui réprime l'expression de *H1* (a : *H2* actif, *H1* éteint). Lorsque le promoteur est découplé de *H2*, le répresseur rHI n'est plus synthétisé et le gène *H1* est exprimé (c : *H1* allumé, *H2* éteint). IR(L) et IR(R) sont les répétitions en orientations inverses qui sont reconnues par la recombinase produite par le gène *hin*. La protéine Hin catalyse une recombinaison entre ces sites et produit de la sorte une inversion du segment qu'ils encadrent. Le gène *hin* est localisé dans la séquence qui s'inverse. Notez que IR(L) et IR(R) sont définis pour la position dans laquelle *H2* est activé et que le promoteur invertible peut exprimer les gènes à gauche de *H2* quand il est dans l'orientation «*H2*-off». (D'après M. Silverman et M. Simon, *Mobile Genetic Elements*, J.A. Shapiro (ed.). Copyright © 1983 chez Academic Press.)

Recombinaison et remaniements chromosomiques

Des remaniements chromosomiques tels que des délétions, des duplications (voir la section suivante), des inversions et des translocations peuvent résulter d'événements de recombinaison, comme cela a été discuté au chapitre 8. Par exemple, la duplication responsable de l'oeil bar chez *Drosophila* est produite par un crossing-over inégal. Des crossing-over inégaux peuvent aussi être décelés dans les chromosomes humains. Certaines thalassémies héréditaires résultent de délétions qui fusionnent deux gènes de globine (figure 8-17), ce qui provoque une anémie. Parmi d'autres maladies provoquées par des remaniements impliquant la recombinaison décrits au chapitre 8, retenons le syndrome du cri du chat et le syndrome de Down.

Duplications et évolution

Il est désormais évident que des duplications de gènes produites par des crossing-over inégaux ont joué un rôle important dans l'évolution des gènes. Dans le chapitre 16, nous avons étudié les familles de gènes dont les membres proviennent de duplications d'un gène ancestral commun, dont les séquences ont divergé par mutations successives. Un bon exemple est la famille des globines (figure 16-20). Un autre exemple est représenté sur la figure 20-29. Il s'agit d'un modèle qui décrit l'évolution de l'albumine et de l'α–fétoprotéine de mammifères. Chaque protéine est constituée de trois domaines qui sont associés par des ponts disulfure (représentés par les barres noires verticales) et qui présentent entre eux de fortes similitudes. Chaque domaine est codé par quatre exons qui sont également organisés de la même façon (partie droite de la figure 20-29). Cet arrangement similaire des exons peut s'expliquer par la triplication d'un gène ancestral contenant quatre exons. Cela aurait produit un gène codant pour une enzyme comportant trois domaines. La duplication de ce gène et l'évolution divergente des séquences dupliquées aurait abouti aux gènes contemporains de l'albumine et de l'α–fétoprotéine de mammifères.

LAVAL / CENTRAL UNIVERSITY

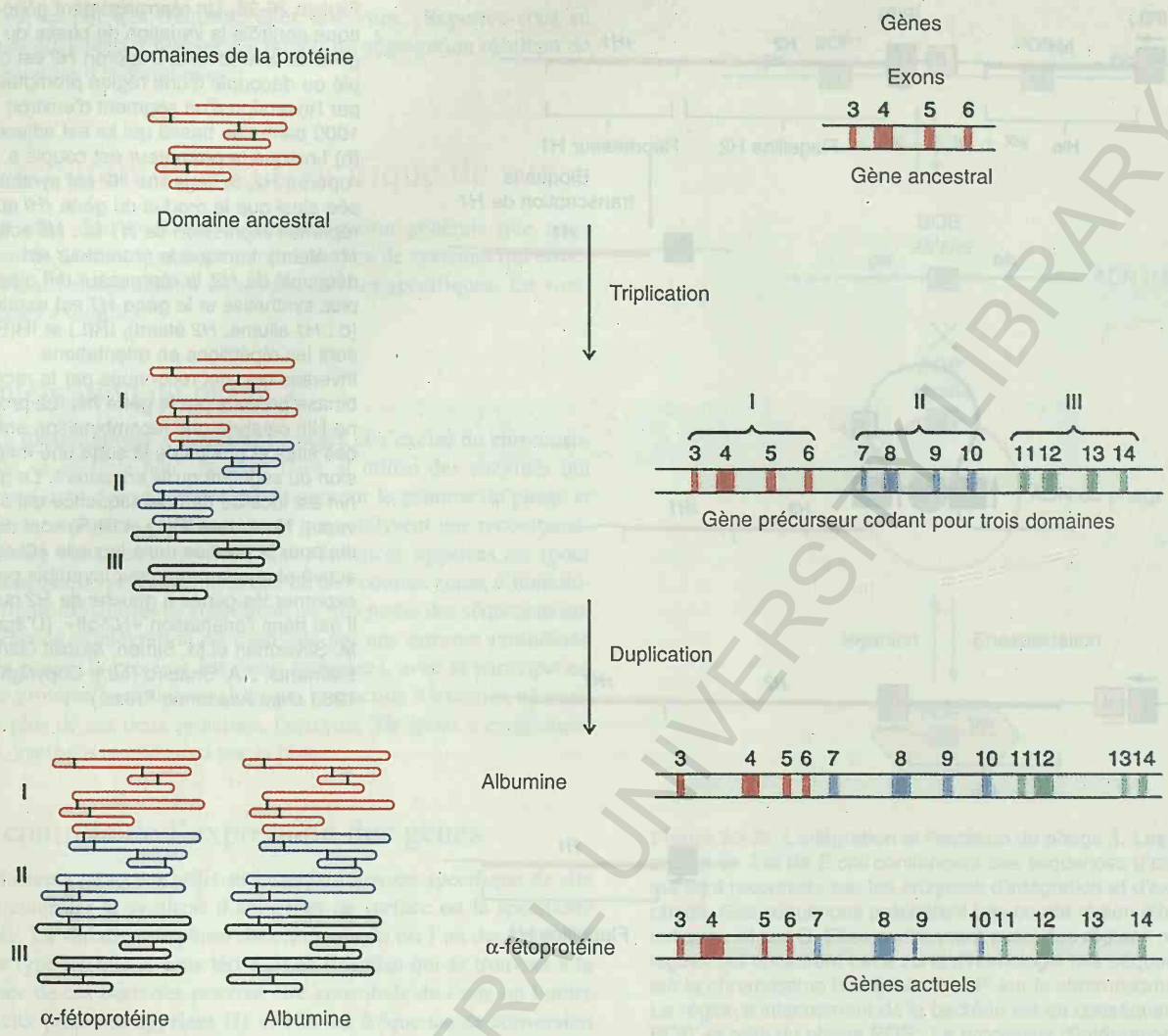


Figure 20-29. Modèle pour l'évolution de l'albumine et de l'α-fétoprotéine de mammifères. (D'après J. Darnell, H. Lodish et D. Baltimore, Biologie moléculaire de la cellule, 2è éd., Copyright 1993, De Boeck Université, De Boeck-Wesmael, Bruxelles.)

R É S U M É

Nous commençons à comprendre les mécanismes moléculaires qui régissent la recombinaison et qui sont à l'origine de la formation de nouvelles combinaisons de gènes résultant de l'échange de matériel génétique entre chromosomes. Des observations génétiques et biochimiques ont amené à concevoir des modèles faisant intervenir des régions d'ADN hétéroduplex pour expliquer le mécanisme des crossing-over. Le mécanisme de la recombinaison est lui-même soumis à un contrôle génétique : il existe des gènes qui affectent la fréquence de la recombinaison. Plusieurs enzymes, dont celles qui sont codées par les gènes *recA*, *recB* et *recC*, ont été identifiées comme des enzymes-clés de la recombinaison chez des bactéries telles qu'*E.coli*.

Diagramme conceptuel

Dessinez un diagramme conceptuel qui relie entre eux le plus grand nombre possible des termes suivants. Remarquez que les termes ne sont pas présentés dans un ordre particulier.

crossing-over / hétéroduplex /chiasmas / conversion génique / correction / rapport non-mendélien / recombinaison / 5 : 3 / défaut d'appariement des bases / hétérozygote

PCU - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Dans les chapitres précédents, nous avons étudié différents mécanismes d'apparition de mutations que ce soit de façon spontanée ou sous l'action de mutagènes. Décrivez la conversion génique et expliquez comment la distinguer de la mutation.

Solution

La conversion génique est un phénomène méiotique de changement dirigé. Un allèle dirige la conversion d'une autre forme allélique en la sienne. Le résultat de la conversion génique sera donc l'excès d'un allèle et le déficit de l'autre à l'issue d'une méiose qui aurait normalement dû produire un nombre égal d'allèles des deux types. Les modèles de recombinaison qui font intervenir des régions d'ADN hétéroduplex permettent d'expliquer la conversion génique de façon plausible.

La mutation est un changement génétique non dirigé qui peut se produire tant à la mitose qu'à la méiose. (Solution de Diane K. Lavett.)

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Chez *Neurospora*, le double mutant *ad3* est constitué par deux mutations, au site 1, localisé à gauche, et au site 2, localisé à droite, dans le gène *ad3*. Ce mutant a été croisé avec une souche de type sauvage en utilisant des stocks parentaux homozygotes pour deux marqueurs extérieurs proches *A* et *B* disposés comme suit, où + représente la séquence de type sauvage :

$$A\ 1\ 2\ B \times a + + b$$

La plupart des asques obtenus avaient le type attendu et montraient une ségrégation typiquement mendélienne. Quelques asques avaient des types inattendus dont certains sont repris ci-dessous de I à III.

I	II	III
A 1 2 *B*	*A* 1 2 *B*	*A* 1 2 *B*
A 1 2 *B*	*A* 1 2 *B*	*A* 1 2 *B*
A 1 2 *b*	*A* 1 2 *B*	*A* 1 2 *B*
A + + *b*	*A* 1 2 *B*	*A* + + *B*
a 1 2 *B*	*a* + + *b*	*a* + 2 *b*
a + + *B*	*a* 1 2 *b*	*a* + + *b*
a + + *b*	*a* + + *b*	*a* + + *b*
a + + *b*	*a* + + *b*	*a* + + *b*

Expliquez l'origine probable des types décrits de I à III en vous basant sur les modèles moléculaires de la recombinaison.

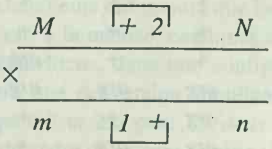
Solution

L'asque I contient deux paires de spores sœurs non identiques. Etant donné que les membres d'une paire de spores sont le produit d'une mitose post-méiotique (voir chapitre 6), ceci prouve que le produit de la méiose contenait l'information pour les marqueurs 1 2 et + + ; en d'autres termes, ces spores contenaient de l'ADN hétéroduplex. Notez que ces paires de spores sont recombinantes pour les marqueurs extérieurs *A* et *B*. Il est donc vraisemblable qu'un crossing-over s'est produit entre les loci *A* et *B*, que l'ADN hétéroduplex résultant du crossing-over recouvrait à la fois les sites 1 et 2 du locus *ad3* et qu'il ne s'est pas produit de correction au niveau de ces sites.

L'asque II montre un rapport de ségrégation 5:3 de doubles mutants 1 2 par rapport aux + +. Ici encore, l'ADN hétéroduplex recouvrait donc les deux loci (dans une configuration non recombinante) mais cette fois il y a eu correction des hétéroduplex 1 2/+ + en 1 2/1 2 probablement par excision et réparation de l'information + + (double conversion ou co-conversion).

L'asque III montre une autre configuration en hétéroduplex non recombinante où la correction ne s'est produite qu'au niveau du site 1, de 1 → + dans l'ascospore 5, ce qui se déduit du rapport 5:3 de ségrégation pour ce site.

2. Lors de croisements de champignons du type qui suit :



dans lequel 1 et 2 représentent les sites mutants d'un gène nutritionnel alors que *M* et *N* sont des loci extérieurs, il est possible de sélectionner les rares recombinants prototrophes + + en étalant le croisement sur un milieu minimum. Les colonies prototrophes qui se développent sont ensuite analysées pour déterminer leur contenu en loci extérieurs. Comme l'on pouvait s'y attendre la combinaison

$$M + + n$$

se rencontre souvent, mais de manière surprenante on trouve aussi des colonies

$$M + + N$$

et

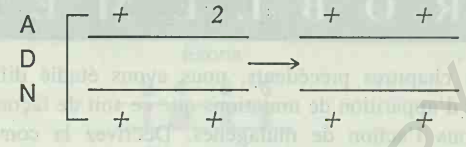
$$m + + n$$

a. Expliquez l'origine de ces deux génotypes en termes de recombinaison moléculaire.

b. Que signifierait l'observation d'une configuration $M + + N$ plus fréquente que $m + + n$?

Solution

a. Il est vraisemblable que $M + + N$ résulte d'un hétéroduplex non recombinant qui recouvrait le site 2, suivi d'une correction de $2 \rightarrow +$.



De la même manière, $m + + n$ pourrait s'expliquer par un hétéroduplex ayant recouvert le site 1 suivi d'une conversion de $1 \rightarrow +$.

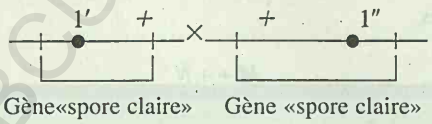
b. Comme $M + + N$ résulte d'une conversion génique du côté droit, il est vraisemblable que l'ADN hétéroduplex se forme plus souvent à partir du côté droit qu'à partir du côté gauche, peut-être parce qu'un site fixe de coupure se trouve du côté droit. (NOTE : un prototrophe pourrait aussi résulter d'une simple correction d'un site au sein d'un ADN hétéroduplex recouvrant les deux sites, mais dans ce cas l'inégalité nécessiterait une autre explication.)

PROBLÈMES

1. Lesquels de ces asques linéaires présentent-ils une conversion au niveau du locus *arg2* ?

+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	*arg*	+	+	*arg*	*arg*
+	*arg*	*arg*	*arg*	*arg*	*arg*
arg	*arg*	*arg*	+	+	*arg*
arg	*arg*	*arg*	*arg*	+	*arg*
arg	+	*arg*	*arg*	*arg*	*arg*
arg	+	*arg*	*arg*	*arg*	*arg*
1	2	3	4	5	6

2. Au locus spore claire de *Ascobolus,* le mutant 1' se trouve dans la partie gauche du gène et le mutant 1" se localise plus à droite. Lorsque l'on croise des souches portant les mutations 1' et 1", on peut détecter à l'œil les asques contenant 6 spores claires et 2 spores noires.



On peut montrer qu'ils résultent pour la majorité de conversions géniques de type suivant :

	+ *1"*
	+ *1"*
	+ *1"*
	+ *1"*
	+ +
noires	
	+ +
	1' +
	1' +

et très rarement de

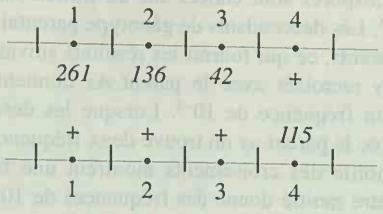
	+ *1"*
	+ *1"*
	+ +
	+ +
	1' +
	1' +
	1' +
	1' +

Quel est le phénomène qui peut rendre compte de cette observation ?

3. On a proposé que le point fixe de rupture à partir duquel se formerait l'ADN hétéroduplex correspondrait à des séquences promoteur. Le résultat suivant est en rapport avec cette hypothèse. Chez le champignon *Podospora,* il existe des mutants dans des cis-

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

trons adjacents 1 à 4, qui déterminent la couleur des spores. Le croisement suivant fut réalisé :



(261, 136, 42 et 115 sont les noms de sites mutants.) Un grand nombre d'asques furent obtenus dont certains présentaient de la conversion génique mais seul l'un d'entre eux (voir ci-dessous) relève de l'hypothèse formulée ci-dessus :

spore	1	*261*	*136*	*42*	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	*115*
	4	+	+	+	*115*

Interprétez ces résultats en fonction de l'hypothèse du rôle joué par le promoteur.

4. De nombreux mutagènes augmentent la fréquence d'échange entre chromatides. Comment expliqueriez-vous cette observation ?

5. Les mutations au locus *46* du champignon *Ascobolus,* de la famille des ascomycètes, produisent des ascospores de couleur claire (appelons-les mutants *a*). Après des croisements entre différents mutants *a*, les asques sont examinés pour la présence de spores noires de type sauvage. Les asques issus de chaque croisement avaient les génotypes suivants :

$a_1 \times a_2$	$a_1 \times a_3$	$a_2 \times a_3$
↓	↓	↓
a_1 +	a_1 +	a_2 +
+ +	a_1 +	a_2 +
+ a_2	+ +	+ +
+ a_2	+ a_3	+ a_3

Interprétez ces résultats à la lumière des modèles discutés dans ce chapitre.

6. Dans le croisement $Am_1m_2B \times am_3b$, l'ordre relatif des sites mutés m_1, m_2 et m_3 et leur ordre par rapport aux marqueurs *A/a* et *B/b* ne sont pas connus. Un asque non linéaire présentant une conversion est obtenu :

Am_1m_2B
Am_1b
am_1m_2B
am_3 b

Interprétez ces résultats à la lumière de la théorie des ADN hétéroduplex et déduisez-en le plus d'informations possible quant à l'ordre des différents marqueurs.

7. Dans le croisement $a_1 \times a_2$ (deux allèles d'un même locus), les asques suivants ont été obtenus :

a_1 +
a_1a_2
a_1a_2
+ a_2

Déduisez-en, au niveau moléculaire, les événements qui ont pu se produire dans l'asque.

8. G. Leblon et J.L. Rossignol ont fait l'observation suivante chez *Ascobolus* : les insertions et les délétions d'une seule paire de bases montrent une conversion de gène de type 6:2 ou 2:6 mais rarement de type 5:3 et 3:5 ou 1:3 et 3:1. Les mutations correspondant à des transitions montrent, elles, des conversions de type 5:3 et 3:5 ou 1:3 et 3:1 mais rarement de type 6:2 et 2:6.

a. Proposez une interprétation de ces résultats en fonction du modèle de l'ADN hétéroduplex.

b. Leblon et Rossignol ont aussi montré qu'il y a nettement moins de conversions 6:2 que de 2:6 pour les insertions alors qu'il y a davantage de 2:6 que de 6:2 pour les délétions (dans lesquelles le rapport est +:*m*). Expliquez ces résultats, toujours à la lumière du modèle de l'ADN hétéroduplex. (Pensez aussi à l'excision de photodimères de thymine.)

c. Enfin, ces chercheurs ont montré que lorsqu'une mutation du cadre de lecture est, à la méiose, combinée avec une mutation de transition au même locus, dans une configuration «cis», les asques qui présentent une conversion simultanée des deux sites sont toujours de type 6:2 et 2:6 pour les *deux* sites (en d'autres termes, la mutation du cadre de lecture semble s'imposer systématiquement sur la mutation de transition). Proposez une explication de ce phénomène.

9. On réalise le croisement + × g_1 entre des souches de l'ascomycète *Sordaria* mutées au locus *grey.* Dans ce croisement, l'ADN hétéroduplex s'étend parfois au-delà du site de l'hétérozygotie et deux zones d'ADN hétéroduplex sont formées (comme discuté dans le présent chapitre). Toutefois la correction de l'ADN hétéroduplex n'est pas efficace à 100 %. En fait 30 % des ADN hétéroduplex ne sont pas corrigés du tout. 50 % sont corrigés en + et 20 % sont corrigés en g_1. Combien cela produira-t-il d'asques de type : a) 6:2 ? b) 2:6 ? c) 3:1 ? d) 1:3 ? e) 5:3 ? f) 3:5 ?

10. Noreen Murray croisa α et β, deux allèles du locus *me*-2 de *Neurospora.* Le croisement faisait également intervenir deux marqueurs encadrant le locus *me*-2, *trp* et *pan,* distants de 5 u.c. Les ascospores furent étalées sur un milieu contenant du tryptophane et du pantothénate mais pas de méthionine. Les dérivés proto-

BCU Lausanne / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tableau 20-3.

Croisement	Génotypes des prototrophes *me-2*⁺			
	trp +	+ *pan*	*trp pan*	+ +
trp α + × + β *pan*	26	59	16	56
trp β + × + α *pan*	84	23	87	15

trophes Met⁺ qui se développèrent furent analysés pour la présence des marqueurs extérieurs, ce qui donna les résultats présentés dans le tableau 20-3. Interprétez ces résultats en fonction des modèles discutés dans ce chapitre. N'oubliez pas de tenir compte des asymétries présentes entre les classes d'asques.

11. Le croisement *Ax* × *ay* est effectué chez *Neurospora*, *x* et *y* sont deux allèle du locus *his-1*, tandis que *A* et *a* sont des allèles du type conjugant. La fréquence de recombinaison entre les allèles de *his-1* est mesurée par la fréquence d'apparition de prototrophes lorsque les ascospores sont étalées sur un milieu sans histidine, elle est de 10^{-5}. Les descendants de génotype parental sont recroisés avec les parents, ce qui fournit les résultats suivants. Tous les descendants *ay* recroisés avec le parent *Ax* donnent des prototrophes avec un fréquence de 10^{-5}. Lorsque les descendants *Ax* sont croisés avec le parent *ay* on trouve deux fréquences de prototrophes : la moitié des croisements montrent une fréquence de 10^{-5}, mais l'autre moitié donne des fréquences de 10^{-2}. Proposez une explication pour cette observation et proposez un plan expérimental pour vérifier votre hypothèse. (NOTE : la recombinaison intragénique est un phénomène méiotique qui se produit dans des cellules diploïdes. Donc, bien que nous ayons à faire ici à un organisme haploïde, les phénomènes de dominance et de récessivité pourraient intervenir dans ce problème.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

21

Mécanismes du changement génétique III : les éléments génétiques transposables

Panachure due à la transposition d'un «gène sauteur»chez le muflier (*Antirrhinum majus*). (Heinz Sadler, Institut Max-Planck).

CONCEPTS-CLÉS

- Il existe des éléments génétiques qui peuvent à l'occasion se transposer d'une position en une autre sur le même chromosome ou sur un chromosome différent.
- Chez les bactéries, les séquences d'insertion, les transposons et le phage *Mu* sont des exemples d'éléments de ce type.
- Les éléments transposables peuvent provoquer des réarrangements génétiques.
- Chez les cellules supérieures, ce sont les éléments transposables de levure, de drosophile et de maïs qui ont été les plus étudiés, mais il en existe également chez les mammifères.
- Certains des éléments transposables eucaryotiques utilisent un intermédiaire d'ARN au cours de leur transposition, alors que chez les procaryotes, la transposition ne fait intervenir que des intermédiaires d'ADN.

BC UNIVERSITY LIBRARY

Au cours des années '30, des études génétiques faites par Barbara Mc Clintock et Marcus Rhoades sur le maïs ont remis en question l'image classique de gènes localisés en une position fixe sur les chromosomes. La littérature scientifique (voir page 656) vit paraître des rapports suggérant l'existence d'éléments chromosomiques capables de se mettre en mouvement et de se déplacer vers un autre locus. Ils furent considérés avec force scepticisme pendant de nombreuses années mais de nos jours il est clair qu'ils sont très répandus dans la nature.

Toute une série de noms évocateurs ont été appliqués à ces éléments : éléments de contrôle, gènes sauteurs, cassettes, gènes mobiles, éléments génétiques mobiles et transposons. Nous retiendrons **éléments génétiques transposables** qui, formellement, est le terme le plus correct et embrasse tous les éléments de ce type. Le terme **transposition** a été utilisé depuis longtemps pour décrire le transfert de segments de chromosome d'une position vers une autre au cours de réarrangements structuraux majeurs. Dans le contexte qui nous intéresse ici, ce qui se transpose semble se limiter à un gène ou à un petit nombre de gènes liés. Toute entité de cette taille peut être appelée **élément génétique.**

Les éléments génétiques transposables semblent pouvoir se déplacer au sein d'un même chromosome ou même vers d'autres chromosomes. On ne sait pas vraiment quel est le rôle génétique qu'ils jouent. Ils se détectent par les anomalies qu'ils produisent dans la structure et la fonction des gènes localisés aux abords des sites où ils s'installent. Une série de méthodes physiques ont aussi été utilisées pour les mettre en évidence. Ils ont été détectés dans des phages, des bactéries, des champignons, des plantes supérieures, des virus et des insectes.

Bien que les éléments transposables aient été découverts chez les eucaryotes, leur nature moléculaire a été comprise d'abord chez les bactéries et les phages. Voyons donc d'abord ce que nous ont apporté les études des éléments bactériens.

Les séquences d'insertion

Les **séquences d'insertion,** ou **éléments IS,** sont des segments d'ADN qui peuvent se déplacer d'une position vers une autre, soit sur un même chromosome, soit sur un autre chromosome. Lorsqu'ils s'introduisent au sein d'un gène, ils en interrompent la séquence codante et, de ce fait, l'inactivent. S'ils sont localisés en aval du promoteur dans un opéron, les éléments IS, à cause de leur taille et parce qu'ils contiennent des signaux de terminaison de la transcription et de la traduction, bloquent également l'expression des autres gènes de l'opéron. C'est en partie grâce à de cette propriété qu'ils furent découverts.

A l'origine, ils ont été découverts chez *E.coli,* plus précisément dans l'opéron *gal*, un groupe de trois gènes impliqués dans le catabolisme du sucre galactose. Les trois gènes adjacents, *E* (épimérase), *T* (transférase) et *K* (kinase) sont transcrits ensemble, à partir du même promoteur (figure 21-1).

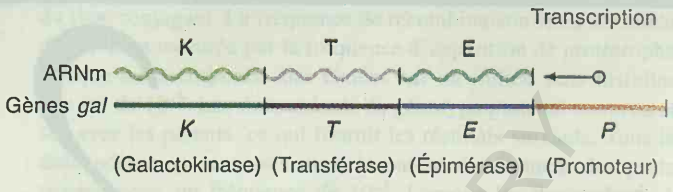


Figure 21-1. Les gènes *gal* de *E.coli.* La galactokinase, la transférase et l'épimérase sont les gènes structuraux qui constituent l'opéron *gal.* Ils sont transcrits en un seul ARN messager initié au niveau du promoteur.

Les mutations polaires

Les IS ont été décelés chez des mutants sélectionnés pour leur déficience dans l'activité de la galactokinase. On pouvait s'attendre à ce que ces mutations se localisent dans le gène *galK* lui-même. En fait, elles se retrouvent en divers sites de l'opéron. Certaines mutations localisées dans le gène de la transférase n'expriment pas la kinase mais synthétisent normalement l'épimérase. Des mutations de ce type affectent donc l'expression des gènes localisés en aval (mais pas en amont) dans l'opéron. On connaissait déjà des mutations montrant cette directionalité, ou **polarité.** Elles avaient été baptisées du terme approprié de **mutations polaires.** Certaines mutations non-sens, par exemple, qui entraînent une terminaison de la traduction, ont un effet polaire. Mais les mutations dont il est question ici ont des propriétés nouvelles. Bien qu'elles puissent réverser, ce qui montre qu'il ne s'agit pas de délétions, leur fréquence de réversion n'est augmentée par aucun mutagène. Il ne s'agit donc ni de mutations non-sens, ni de mutations de phase, ni de mutations ponctuelles d'aucune sorte. C'est dans les années '60 que l'on a compris qu'il s'agissait d'insertion de segments d'ADN.

Démonstration physique de l'insertion d'ADN

Rappelons que le phage λ s'intègre à côté de l'opéron *gal* et qu'il est facile d'obtenir des phages $\lambda dgal$ qui ont prélevé la région gal du chromosome bactérien (page 299). Lorsque les mutations polaires sont incorporées dans un phage $\lambda dgal$ et que l'on compare la densité de flottaison en gradient de chlorure de césium (CsCl) de ces phages à celle du phage $\lambda dgal$ normal, on s'aperçoit que l'ADN qui porte la mutation polaire est plus long que l'ADN de type sauvage. Cette expérience démontre clairement que les mutations étudiées sont provoquées par l'insertion d'un long segment d'ADN dans l'opéron *gal.* La figure 21-2 décrit l'expérience plus en détail.

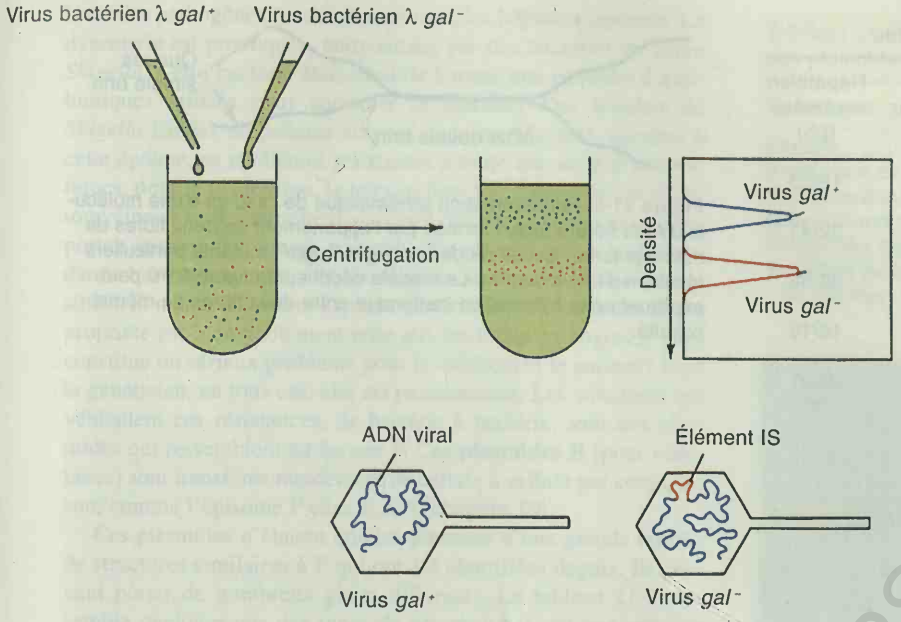


Figure 21-2. Grâce à l'utilisation de particules de phage λ qui portent les gènes galactose sauvages ou mutés de *E.coli*, on a pu démontrer le caractère insertionnel de certaines mutations *gal*⁻. Les particules de virus ont été sédimentées en gradient de chlorure de césium (CsCl). Les particules λ*gal*⁻ se sont retrouvées dans une bande de densité supérieure à celle des particules λ*gal*⁺. Comme les particules ont toutes le même volume et des enveloppes de même masse, l'augmentation de densité reflète une augmentation de la masse d'ADN qu'elles contiennent, ce qui indique que la mutation *gal*⁻ résulte de l'insertion d'un fragment d'ADN. (S.M. Cohen et J.A. Shapiro, «Transposable Genetic Elements» Copyright © 1980 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

Visualisation directe de l'insertion d'ADN

En hybridant l'ADN dénaturé d'un λ*dgal* porteur de la mutation d'insertion avec celui d'un λ*dgal* de type sauvage, on peut visualiser l'insertion au microscope électronique. Dans ce type d'expérience, les ADN à double brin qui se reforment peuvent contenir une fibre de l'un des ADN parentaux et la fibre complémentaire de l'autre, donc une fibre sauvage et une fibre mutante. On les appelle hétéroduplex. Lorsque la mutation étudiée est une mutation ponctuelle, elle ne se voit évidemment pas sur la molécule hétéroduplex. Par contre, s'il s'agit d'une insertion, chaque molécule hétéroduplexe présente une boucle d'ADN simple brin qui n'a pas d'homologue dans l'ADN sauvage (figure 21-3). La longueur de cette boucle peut être déterminée si l'on inclut, dans la préparation d'ADN, un élément de dimension connue. La boucle s'avéra mesurer 800 paires de bases environ.

Identification de différents éléments IS

La question qui vient naturellement à l'esprit est évidemment de savoir si ces insertions représentent un segment d'ADN aléatoire ou une séquence bien définie. Des expériences d'hybridation ont révélé que les mutations d'insertion sont dues à un petit nombre de séquences. Ces expériences requièrent tout d'abord l'isolement de phages λ*dgal* qui portent l'une ou l'autre mutation polaire. On en extrait alors l'ADN qui est ensuite utilisé pour préparer in vitro de l'ARN radioactif. Certains des fragments de cet ARN s'hybrident à l'ADN des phages mutants mais pas à celui des phages sauvages ce qui confirme la présence d'une séquence additionnelle chez le mutant. On peut ensuite utiliser ces fragments particuliers pour tester l'ADN d'autres phages mutants. Cette nouvelle expérience révèle que le même segment d'ADN se retrouve chez d'autres mutants mais qu'il est localisé en des endroits différents.

Les mutants d'insertion sont classés en fonction de leur profil d'hybridation. La première séquence IS qui fut découverte dans l'opéron *gal* mesure 800 paires de bases et s'appelle IS1. Une autre, qui mesure 1350 paires de bases, s'appelle IS2. Le tableau 21-1 contient une liste de quelques IS et précise leurs tailles respectives. La nature des répétitions inversées mentionnées dans ce

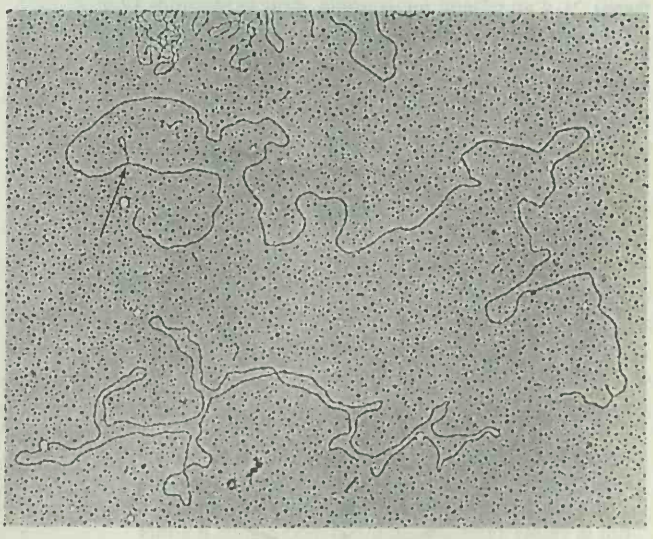


Figure 21-3. Vue au microscope électronique d'un ADN hétéroduplex λ*dgal*ˢ/λ*dgal*ᵐ. La boucle à simple brin (indiquée par la flèche) résulte de la présence d'une séquence d'insertion dans λ*dgal*ᵐ. (D'après A.Ahmed et D.Scraba «The nature of the *gal3* Mutation of *Escherichia coli* », *Molecular and General Genetics* 136, 1975, 233.)

Tableau 21-1. Séquences d'insertion des procaryotes

Séquence d'insertion	Nombre de copies chez *E.coli*	Longueur (pb)	Répétition inversées (pb)
IS1	5 à 8 copies par chromosome	768	18/23
IS2	5 sur le chromosome ; 1 sur F	1327	32/41
IS3	5 sur le chromosome ; 2 sur F	1400	32/38
IS4	1 ou 2 copies sur le chromosome	1400	16/18
IS5	Inconnu	1250	court
γ-δ (Tn1000)	1 sur F ; 1 ou plus sur le chromosome	5700	35
Segment de pSC101	Sur le plasmide pSC101	200	30/36

SOURCE : M.P. Calos et J.H. Miller, *Cell* 20, 1980, 579-95.

tableau est discutée dans la section «Transposons».

On sait maintenant que le génome de la souche standard sauvage *E.coli*-K12 contient de nombreux IS. On y trouve 8 copies de l'élément IS1, 5 de IS2, et des copies d'autres IS dont nous ne parlerons pas en détail ici. Le fait que l'on puisse trouver une séquence IS dans n'importe quel gène que l'on étudie, montre clairement que ces éléments sont doués de mobilité et se transposent au sein du génome de leur hôte. Mais l'insertion ne provoque une mutation ou un autre type d'altération détectable d'une fonction cellulaire que lorsqu'elle se produit en certaines positions particulières du génome, par exemple au sein d'un gène. Les séquences IS sont aussi présentes sur certains plasmides et sur certains phages. La figure 21-4 en montre un exemple, dans le plasmide F*lac*.

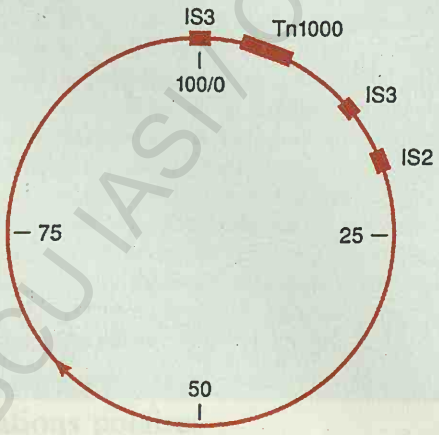


Figure 21-4. Carte génétique et physique du plasmide F. Les positions des séquences insérées IS2, IS3 et Tn1000 sont indiquées par rapport à des coordonnées allant de 0 à 100. La flèche montre l'origine et la direction du transfert d'ADN F durant la conjugaison.

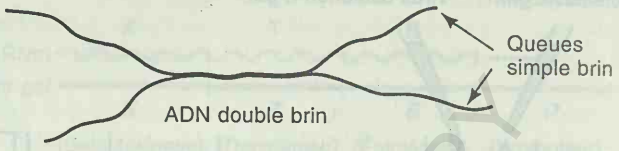


Figure 21-5. Représentation schématique de l'aspect d'une molécule d'ADN hétéroduplex formée par l'appariement de deux fibres de même polarité, issues de deux phages $\lambda dgal^m$ mutants particuliers résultant d'une insertion. Le modèle décrit sur la figure 21-6 peut expliquer cette hybridation inattendue entre deux fibres de même polarité.

Message Le génome bactérien contient des segments d'ADN appelés IS qui peuvent se déplacer d'une position vers une autre sur le même chromosome ou vers un autre chromosome.

Orientation des IS

Les deux fibres d'ADN du phage $\lambda dgal$ ont des densités de flottaison différentes parce qu'elles contiennent des séquences de bases différentes. Après dénaturation, elles peuvent être séparées par ultracentrifugation. Dans certains cas, les *mêmes* fibres de deux mutants différents peuvent former une molécule hybride qui, sous le microscope électronique, présente un aspect caractéristique : un court segment double brin se terminant par quatre longues queues simple brin (figure 21-5). Cette structure s'explique si l'on suppose que l'IS est inséré dans des orientations opposées chez les deux mutants (figure 21-6).

Les transposons

Dans les années '50, une propriété assez effrayante de certaines

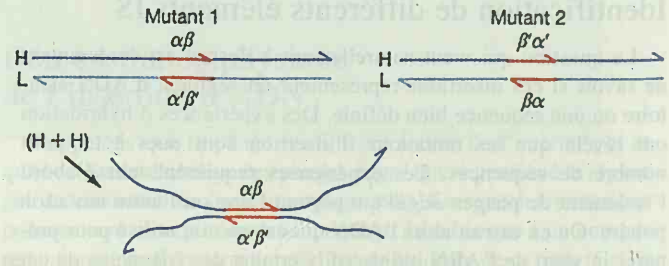


Figure 21-6. Un modèle qui explique la formation de molécules d'ADN hétéroduplex telles que décrites sur la figure 21-5. IS1 est représentée par une ligne colorée. α et β représentent les extrémités de la séquence IS1 ; H et L représentent respectivement les fibres d'ADN $\lambda dgal$ de forte et faible densité. La formation de l'hybride s'explique si l'on suppose que la séquence IS1 est insérée dans des orientations opposées dans chacun des mutants.

BOU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

bactéries pathogènes fut découverte dans les hôpitaux japonais. La dysenterie est provoquée, entre autres, par des bactéries du genre *Shigella*. Cette bactérie était sensible à toute une panoplie d'antibiotiques utilisés pour contrôler la maladie. Des souches de *Shigella* isolées de patients soignés dans les hôpitaux japonais à cette époque, se révélèrent résistantes à toute une série d'antibiotiques, dont la pénicilline, la tétracycline, les sulfamides, la streptomycine et le chloramphénicol. Cette résistance multiple se comportait comme une entité, transmissible en une fois à la descendance bactérienne mais aussi à d'autres souches de *Shigella* sensibles, et même à d'autres espèces bactériennes apparentées. Cette propriété est incroyablement utile aux bactéries pathogènes, mais constitue un sérieux problème pour le médecin et le patient ! Pour le généticien, en tous cas, elle est passionnante. Les structures qui véhiculent ces résistances, de bactérie à bactérie, sont des plasmides qui ressemblent au facteur F. Ces **plasmides R** (pour *résistance*) sont transférés rapidement de cellule à cellule par conjugaison, comme l'épisome F chez *E.coli* (chapitre 10).

Ces plasmides n'étaient que les premiers d'une grande famille de structures similaires à F qui ont été identifiées depuis. Ils peuvent porter de nombreux gènes différents. Le tableau 21-2 rassemble quelques-uns des types de déterminants qui peuvent être portés par des plasmides. Comment ces derniers agissent-ils ? Comment passent-ils de cellule en cellule ? Actuellement on connaît la réponse à certaines de ces questions grâce à la découverte des *Transposons*.

Tableau 21-2. Déterminants génétiques portés par des plasmides

Caractères	Exemples de plasmides
Fertilité	F, R1, Col
Production de bactériocines	Col E1
Résistance aux métaux lourds	R6
Métabolisme du camphre	Cam
Production d'entérotoxine	Ent
Induction de tumeurs chez les plantes	Ti (*dans Agrobacterium tumefaciens*)

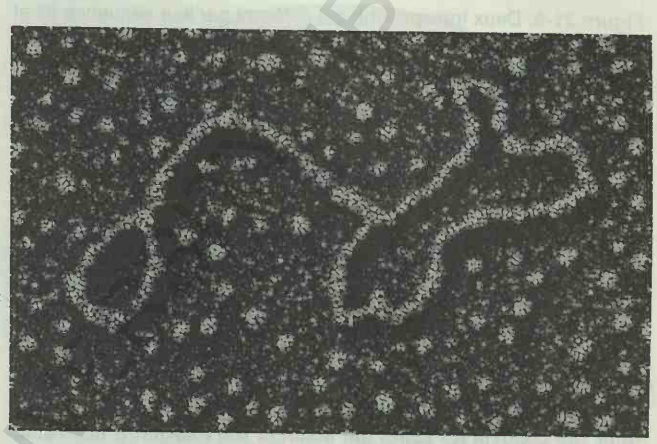


Figure 21-7. Structure d'ADN particulière observée lorsque l'on renature l'ADN après l'avoir dénaturé. La région en répétition inverse forme un segment à double brin, terminé par deux boucles à simple brin. (Photo fournie par S.N. Cohen.)

La structure physique des transposons

Si l'on isole l'ADN d'un plasmide qui confère par exemple la résistance à la kanamycine, qu'on le dénature et qu'on permet ensuite à l'ADN simple brin ainsi obtenu de se renaturer lentement, l'observation au microscope électronique révèle la formation de structures particulières. Certaines fibres se présentent sous la forme d'un cercle auquel est appendue une structure en forme de «décapsuleur» (figure 21-7). Le manche en est formé d'ADN double brin qui résulte de l'appariement de deux **séquences répétées inverses (IR)** présentes sur le plasmide (figure 21-8). Des études ultérieures ont révélé que, dans de nombreux cas, les séquences IR sont en fait constituées par une paire de séquences IS. Deux séquences IS10, par exemple, forment les extrémités d'un élément qui code pour la résistance à la tétracycline (figure 21-9). Mais dans d'autres cas ces séquences IR sont nettement plus

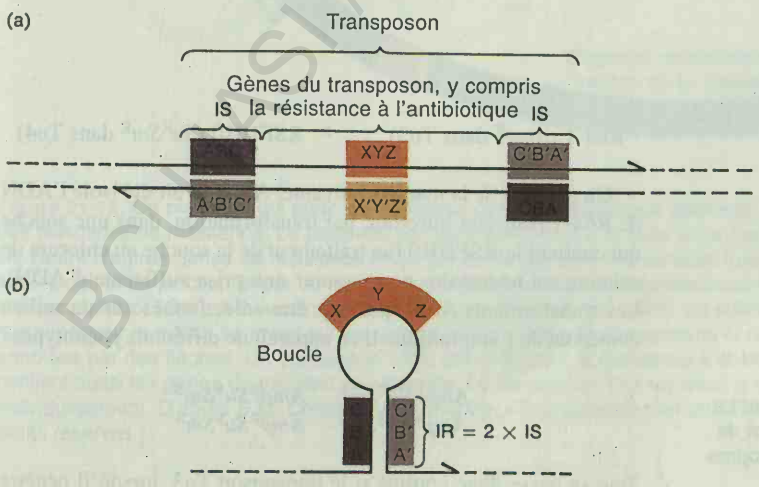


Figure 21-8. Une explication pour la formation de la structure présentée dans la figure 21-7. La structure s'appelle un transposon. (a) Le transposon sous sa forme à double brin, avant dénaturation. Notez la présence des séquences IS en orientation inverse aux extrémités. (b) Une boucle s'est formée à la suite de la renaturation des deux séquences IS du même brin, ce qui forme la partie double brin de la structure de la figure 21-7. Les gènes du transposon sont dans une boucle à simple brin.

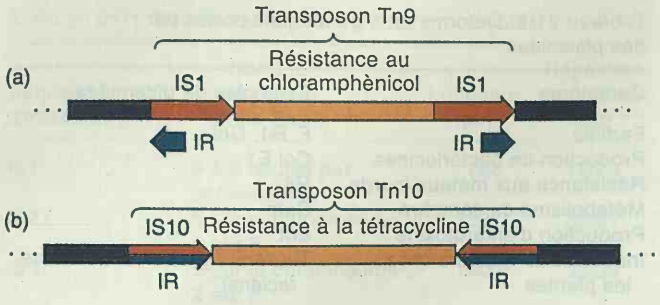


Figure 21-9. Deux transposons qui diffèrent par leur séquence IR et leurs gènes de résistance (a). Tn9 n'a qu'une courte séquence IR parce que les deux IS1 qui le flanquent sont dans la même orientation mais portent, elles, de courtes séquences IR (b). Tn10 possède une longue séquence IR parce que les deux IS10 qui en font partie sont elles-mêmes en orientation inverse.

courtes.

Les gènes qui codent pour la résistance aux antibiotiques, ou pour d'autres déterminants génétiques portés par certains plasmides, sont localisés entre les séquences IR et constituent la «boucle» du décapsuleur. C'est l'ensemble des séquences IR et des gènes qu'elles encadrent qui s'appelle un **transposon (Tn).** Les transposons sont donc plus longs que les éléments IS puisqu'ils contiennent d'autres séquences en supplément. Le reste du plasmide qui contient les gènes qui assurent son transfert d'une bactérie à l'autre s'appelle **région RTF** (pour fonctions de transfert des résistances) (figure 21-10). Une partie des transposons connus sont repris dans le tableau 21-3.

Mouvement des transposons

Un transposon peut sauter d'un plasmide vers un autre plasmide (figure 21-11) ou d'un plasmide vers un chromosome. Considérons maintenant une expérience qui démontre un tel événement de transposition.

Un grand plasmide de *E.coli,* R64-1, contient un transposon (Tn3) qui code pour la résistance à l'ampicilline (Amp^R). L'expérience vise à démontrer la transposition du Tn3 vers un autre plasmide, RSF1010, qui, lui, porte un autre transposon (Tn4) contenantt des gènes qui codent pour la résistance à la sulfonamide (Su^R) et à la streptomycine (Sm^R).

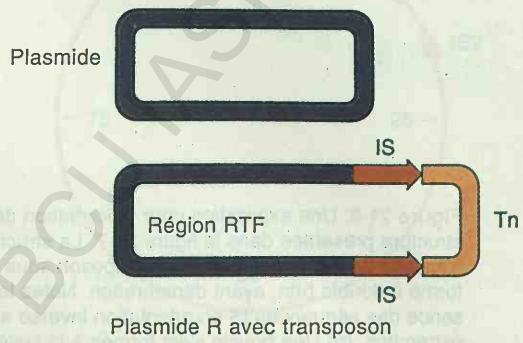


Figure 21-10. Insertion d'un transposon (Tn) dans un plasmide. La partie dite RTF du plasmide contient les gènes de résistance et de transfert du plasmide. Tn comprend ses éléments IS et ses propres gènes de résistance.

Tableau 21-3.

Transposon	Marqueur	Longueur (pb)	Répétition inversée
Tn1	Ampicilline	4957	38
Tn2	Ampicilline		
Tn3	Ampicilline		
Tn4	Ampicilline, streptomycine, sulfanilamide	20500	courte
Tn5	Kanamycine	5400	1500
Tn6	Kanamycine	4200	Non détectable au microscope électronique
Tn7	Triméthoprime, streptomycine	14000	Non détectable au microscope électronique
Tn9	Chloramphénicol	2638	18/23
Tn10	Tétracycline	9300	1400
Tn204	Chloramphénicol acide fusidique	2457	18/23
Tn402	Triméthoprime	7500	Non détectable au microscope électronique
Tn501	Ions mercuriques	7800	38
Tn551	Erythromycine	5200	35
Tn554	Erythromycine, spectinomycine	6200	Non déterminé
Tn732	Gentamycine, tobramycine	11000	Non déterminé
Tn903	Kanamycine	3100	1050
Tn917	Erythromycine	5100	Courte
Tn951	*lac*	16600	Courte
Tn1681	Entérotoxine thermostable	2088	768 (IS1)
Tn1721	Tétracycline	10900	courte

Source : M.P. Calos et J.H. Miller, *Cell,* 20, 1980, 579-595.

R64-1 (Amp^R dans Tn3) ⟶ RSF1010 (Su^RSm^R dans Tn4)

On procède de la manière suivante. Après avoir été isolé l'ADN de R64-1 peut être introduit, par transformation, dans une souche qui contient le RSF1010 (un traitement de la souche au chlorure de calcium est nécessaire pour assurer une prise suffisante d'ADN). Les transformants Amp^R peuvent être sélectionnés sur un milieu contenant de l'ampicilline. Il en apparaît de différents phénotypes :

$Amp^RSu^RSm^R$ $Amp^RSu^RSm^S$
$Amp^RSu^SSm^R$ $Amp^RSu^SSm^S$

Tout se passe donc comme si le transposon Tn3, lorsqu'il pénètre

BCU LAUSANNE / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

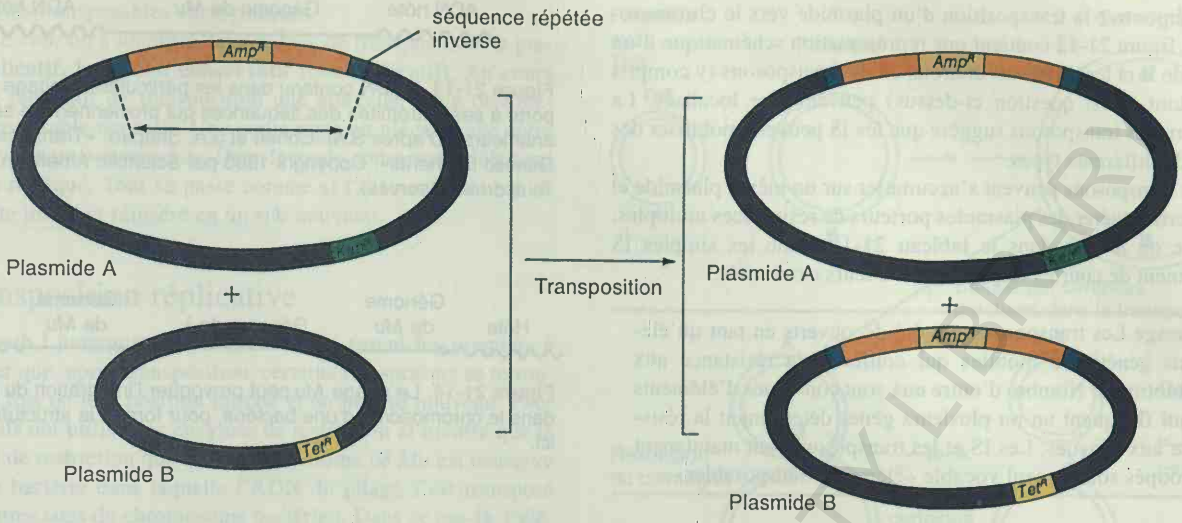


Figure 21-11. Transposition du transposon Tn3 qui porte un gène de résistance à l'antibiotique ampicilline (*Amp*ʳ). A l'origine, le Tn3 est inséré dans le plasmide A qui contient, en outre, un gène de résistance à la kanamycine (*Kan*ʳ). Le plasmide B qui porte, lui, un gène de résistance à la tétracycline (*Tet*ʳ) reçoit une copie du transposon. Le nouveau plasmide B confère la double résistance à l'ampicilline et à la tétracycline. (D'après S.M. Cohen et J.A. Shapiro, «Transposable Genetic Elements». Copyright 1980 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés).

dans la souche transformée, s'insérait dans le génome, soit en dehors du Tn4 soit dedans. S'il s'insère dans le Tn4 original, il peut inactiver soit l'une des résistances portées par ce transposon, soit les deux. Ceci dépend évidemment de la localisation du point d'insertion du Tn3 au sein du Tn4. Il est possible de détecter, par microscopie électronique, l'apparition de nouvelles structures en décapsuleur sur les ADN des RSF1010 contenus dans les souches transformées. Des expériences du même type peuvent être utilisées

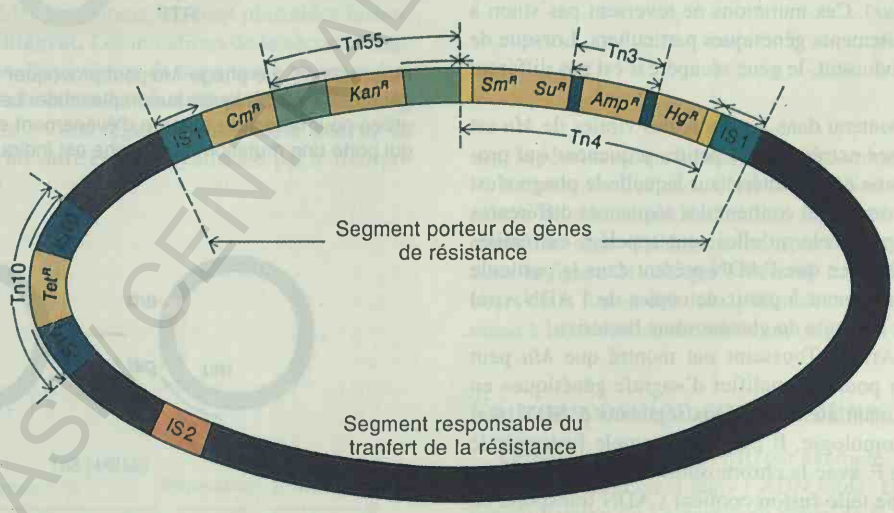


Figure 21-12. Ce plasmide qui porte de nombreux gènes de résistance différents illustre le rôle que jouent les transposons dans l'évolution des plasmides de résistance. Le plasmide semble s'être formé à la suite de la fusion de deux segments, l'un contenant des gènes de résistance, l'autre d'autres gènes de résistance et les gènes de transfert ; ils auraient fusionné grâce aux séquences d'insertion (IS1) que l'on retrouve à leurs points de jonction et par où les deux segments peuvent occasionnellement se dissocier. Des gènes codant pour les résistances au chloramphénicol (*Cm*ʳ), à la kanamycine (*Kan*ʳ), à la streptomycine (*Sm*ʳ), au sulfonamide (*Su*ʳ), à l'ampicilline (*Amp*ʳ) et au mercure (*Hg*ʳ) sont regroupés sur le même segment qui est constitué d'une série de transposons et de séquences IS. Les extrémités en répétition inversées sont annotées par des flèches. Un transposon Tn10 qui code pour la résistance à la tétracycline (*Tet*ʳ) se retrouve sur le second segment qui contient aussi les gènes de transfert du plasmide. Le transposon Tn3 est dans le transposon Tn4. Chacun des transposons peut se transposer individuellement. D'après S.M. Cohen et J.A. Shapiro, «Transposable Genetic Elements» Copyright © 1980 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

pour démontrer la transposition d'un plasmide vers le chromosome. La figure 21-12 contient une représentation schématique d'un plasmide R et les différents endroits où des transposons (y compris ceux dont il est question ci-dessus) peuvent être localisés. La structure des transposons suggère que les IS peuvent mobiliser des gènes de différents types.

Des transposons peuvent s'accumuler sur un même plasmide et de la sorte générer des plasmides porteurs de résistances multiples. Comme on le voit dans le tableau 21-1, même les simples IS contiennent de courtes séquences IR à leurs extrémités.

Message Les transposons ont été découverts en tant qu'éléments génétiques mobiles qui confèrent la résistance aux antibiotiques. Nombre d'entre eux sont constitués d'éléments IS qui flanquent un ou plusieurs gènes déterminant la résistance aux drogues. Les IS et les transposons sont maintenant regroupés sous le seul vocable «éléments transposables».

Le phage *Mu*

A première vue, le phage *Mu* ressemble aux autres phages. Nous en parlons ici, parce que, bien que ce soit un vrai virus, il partage avec les IS certaines propriétés très caractéristiques et parce que son étude à fourni les premiers indices concernant les mécanismes moléculaires de la transposition chez les procaryotes. La double hélice d'ADN de *Mu* est constituée de 36 000 paires de bases et est donc bien plus longue que celle d'un IS. Mais comme les IS, l'ADN du phage s'insère n'importe où et dans l'une ou l'autre orientation dans les génomes bactériens et plasmidiques. Comme eux, il provoque une mutation en son site d'insertion (c'est d'ailleurs cette propriété qui lui a valu son nom ; *Mu* est une abréviation de *mutateur*). Ces mutations ne réversent pas sinon à la suite de certains traitements génétiques particuliers. Lorsque de telles réversions se produisent, le gène récupéré n'est pas différent du gène sauvage.

L'ADN de phage contenu dans les particules virales de *Mu* est linéaire et contient à ses extrémités de petites séquences qui proviennent du chromosome de la bactérie sur laquelle le phage s'est multiplié. Chaque génome viral contient des séquences différentes (figure 21-13). C'est pour cela qu'elles sont appelées extrémités variables. Elles sont là parce que l'ADN présent dans la particule virale est emballé directement à partir de copies de l'ADN viral intégrées en différents endroits du chromosome bactérien.

Michel Faelen et Ariane Toussaint ont montré que *Mu* peut jouer un rôle que l'on pourrait qualifier d'«agrafe génétique» en mobilisant et en fusionnant au hasard deux segments d'ADN totalement dépourvus d'homologie. Il peut par exemple fusionner le phage λ, ou l'épisome F, avec le chromosome bactérien. Le chromosome résultant d'une telle fusion contient l'ADN transporté en sandwich entre deux copies de *Mu* dans la même orientation (figure 21-14). *Mu* peut aussi transférer des marqueurs bactériens sur un plasmide. Ici encore l'ADN transféré est en sandwich entre deux copies de *Mu* (figure 21-15). Enfin, il peut provoquer divers réarrangements chromosomiques (figure 21-15/21-16).

Le mécanisme de la transposition

Différents éléments transposables procaryotiques utilisent différents mécanismes de transposition et ceux-ci, comme nous le verrons plus loin, diffèrent à leur tour des mécanismes utilisés par

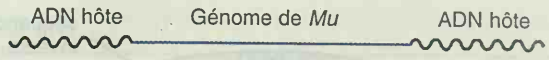


Figure 21-13. L'ADN contenu dans les particules de phage *Mu* porte à ses extrémités des séquences qui proviennent de ses hôtes antérieurs. (D'après S.M. Cohen et J.A. Shapiro, «Transposable Genetic Elements». Copyright 1980 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés).

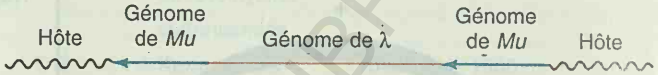


Figure 21-14. Le phage *Mu* peut provoquer l'intégration du phage λ dans le chromosome d'une bactérie, pour former la structure décrite ici.

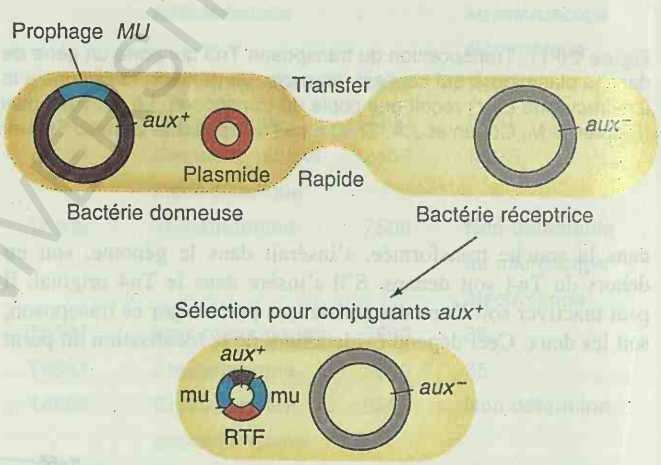


Figure 21-15. Le phage *Mu* peut provoquer la transposition de gènes chromosomiques sur un plasmide. Le système de sélection utilisé pour détecter ce genre d'événement est illustré ici. Un gène qui porte une mutation auxotrophe est indiqué par *aux*–.

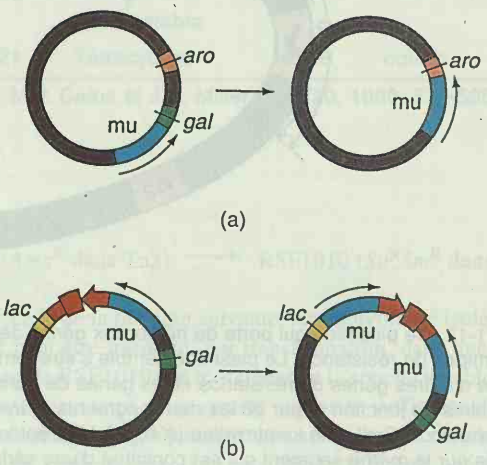


Figure 21-16. Le phage *Mu* peut provoquer la délétion ou l'inversion d'un segment d'ADN qui lui est adjacent. (a) La région *gal* est éliminée suite à la transposition du génome de *Mu*. (b) La région du chromosome d'une souche *Hfr* contenant le facteur F est inversée à la suite de la transposition du génome de *Mu*.

les éléments transposables eucaryotiques.

Chez *E.coli,* on a identifié deux modes de transposition, le premier **réplicatif,** le second **conservatif** (non réplicatif). Au cours du mode réplicatif de transposition une nouvelle copie de l'élément transposable apparaît. Une copie reste en place et une autre se retrouve en un nouveau site. Dans le mode conservatif l'élément n'est pas répliqué. Tout se passe comme si l'élément était excisé de son site initial et réinséré en un site nouveau.

La transposition réplicative

Elisabeth Ljungquist et Ahmad Bukhari furent les premiers à démontrer que, après transposition, certains transposons se retrouvent à la fois en leur position initiale et en un site nouveau. Pour ce faire, ils ont utilisé des enzymes de restriction et montré que le fragment de restriction qui contient le génome de *Mu* est conservé dans une bactérie dans laquelle l'ADN du phage s'est transposé vers d'autres sites du chromosome bactérien. Dans ce cas-là, l'élément ne «saute» donc pas d'un site vers un autre en s'excisant du premier et en se réinsérant ailleurs. Il se «réplique» en un site nouveau, abandonnant une copie au site initial.

En analysant des mutants d'un autre type de transposon, Fred Heffron et David Sherratt et leurs collaborateurs ont mis en évidence une autre caractéristique importante du mécanisme de la transposition. Ils étudiaient le transposon Tn3 (figure 21-17). Ils purent classer les mutations qui bloquent la transposition en deux catégories. Une classe de mutations trans-récessives se localisent dans le gène qui code pour l'enzyme transposase qui catalyse la transposition. Les mutations de la seconde classe, cis-dominantes celles-là, provoquent l'apparition, lors de la transposition, d'un intermédiaire particulier. La figure 21-18 décrit la transposition d'un élément Tn3 d'un plasmide vers un autre. L'intermédiaire est en fait un plasmide double qui contient les deux plasmides fusionnés. On l'appelle un **cointégrat.** Les mutations de la seconde classe provoquent la délétion d'une région du transposon où se produit une recombinaison qui aboutit à la **résolution** du cointégrat en deux plasmides plus petits. Cette région s'appelle **site interne de résolution (Res).** C'est un autre enzyme synthétisé par le transposon, la résolvase, qui stimule cette recombinaison (figure 21-17).

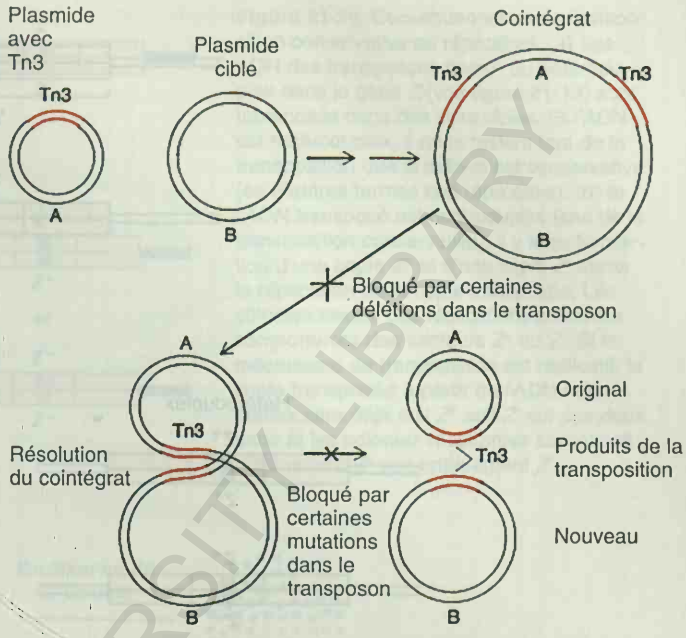


Figure 21-18. La transposition de Tn3 se fait par l'intermédiaire d'une structure appelée cointégrat. Cette structure s'observe dans le cas de certains dérivés de Tn3 qui contiennent une délétion de leur partie interne. La délétion bloque la résolution de cet intermédiaire parce qu'elle élimine une séquence, le site interne de résolution IRS, qui est le siège d'une recombinaison menant normalement à la résolution de ce cointégrat.(D'après F.Heffron, *Mobile Genetic Elements,* pp. 223-260. Edité par J.A. Shapiro. Copyright © 1983 par Academic Press.)

La mise en évidence d'un intermédiaire de type cointégrat a permis de démontrer le caractère réplicatif de la transposition de toute une série d'éléments transposables procaryotiques. Notez, dans la figure 21-18, que l'élément transposable est dupliqué au cours de la fusion des deux plasmides et que la recombinaison qui mène à la résolution du cointégrat régénère le plasmide initial.

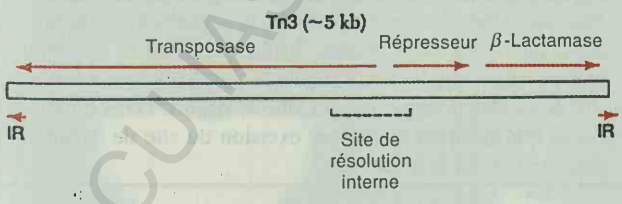


Figure 21-17. Structure du transposon Tn3. Tn3 est constitué de 4957 paires de bases et code pour 3 polypeptides : la transposase, requise pour la transposition, le répresseur qui contrôle le gène de la transposase (voir chapitre 18), et la β-lactamase qui confère la résistance à l'ampicilline. Tn3 contient à ses extrémités des séquences répétées inverses (IR) de 38 paires de bases et en son centre une séquence appelée *site de résolution interne,* siège de la recombinaison spécifique nécessaire à la résolution des cointégrats.

La transposition conservative

Certains transposons, Tn10 par exemple, s'excisent du chromosome et se réintègrent dans l'ADN cible. Dans ce cas-là, il n'y a pas réplication de l'élément au cours de la transposition ; il disparaît de son premier site d'insertion. Pour la démonstration, Nancy Kleckner et ses collaborateurs ont construit des ADN hétéroduplexes de dérivés du phage λ portant une insertion de Tn10 dans lesquels la région *lac* de *E.coli* avait été insérée, soit sous sa forme sauvage (*LacZ*$^+$) soit sous une forme mutée (*LacZ*$^-$). Les molécules hétéroduplexes contiennent donc un brin *lacZ* sauvage et un brin *lacZ* muté. La figure 21-19 décrit cette partie de l'expérience. Les ADN hétéroduplexes sont utilisés pour infecter des bactéries dont la région *lac* est absente. Les bactéries qui ont acquis une copie du Tn10 dans leur génome peuvent être aisément sélectionnées sur base de leur caractère Tet^r. Différents types de colonies sont observés suite à la transposition des transposons

BCUMASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

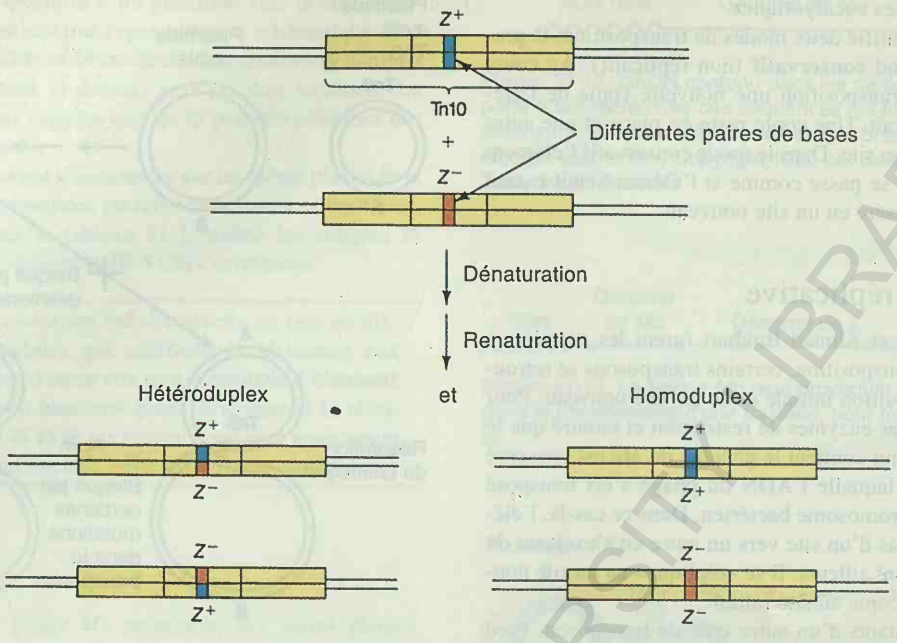


Figure 21-19. Formation d'éléments Tn10 homo- et hétéroduplexes. Un mélange d'ADN de phages λ qui portent des Tn10 qui diffèrent par seulement trois paires de bases, est soumis à des conditions dénaturantes puis renaturantes. Ceci produit un mélange de formes homo- et hétéroduplexes. Les différences de bases dans le gène *Z* des Tn10 permet de détecter, à la fin de l'expérience, quelles cellules ont reçu une molécule homo- ou hétéroduplexe du gène *Z* par transposition du Tn10. (D'après J. Bender et N. Kleckner, *Cell* 45, 1986, 801-815.)

hétéroduplexes Z^+/Z^- (figure 21-20). Si une réplication se produisait (ce qui serait le cas lors d'une transposition réplicative), les colonies devraient être soit complètement Lac$^+$, soit complètement Lac$^-$ puisque la réplication convertirait les hétéroduplexes en molécules filles homoduplexes. Par contre, si la transposition était conservative et se produisait sans l'intervention d'une réplication du transposon, chaque colonie dériverait d'une bactérie hétéroduplexe *lacZ*$^+$/*lacZ*$^-$. De telles colonies seraient en partie Lac$^+$ et en partie Lac$^-$. En utilisant un milieu qui colore différemment les colonies Lac$^+$ et Lac$^-$, on peut observer facilement la présence de secteurs Lac$^+$ et Lac$^-$.

La majorité des colonies obtenues par Kleckner et ses collaborateurs étaient constituées de tels secteurs. L'expérience établit donc que la transposition de Tn10 est conservative (figure 21-21). Tn10 — et sans doute d'autres transposons de *E.coli* — se transposent donc en s'excisant de l'ADN donneur et en se réintégrant dans la molécule d'ADN receveuse.

Les conséquences moléculaires de la transposition

L'analyse des conséquences moléculaires de la transposition a révélé une autre caractéristique de son mécanisme : en s'intégrant à leur nouveau site, les éléments transposables provoquent une duplication au niveau du site cible, que la transposition soit conservative ou réplicative. La figure 21-22 montre que l'intégration d'un IS1 au sein d'un gène s'accompagne de la répétition de 9 paires de bases du site cible. L'analyse montre que cette répétition n'est pas le résultat d'une recombinaison réciproque, comme c'est par exemple le cas lors de l'intégration du phage λ (voir page 630). Ici la formation de la duplication fait partie du processus de transposition. Le nombre de paires de bases dupliquées est caractéristique de chaque élément. Chez les bactéries, ce sont les répétitions de 9 et 5 paires de bases qui sont les plus courantes.

Les observations que nous venons de passer en revue ont été incorporées dans des modèles de transposition plutôt compliqués. La plupart d'entre eux postulent que la transposase codée par l'élément lui-même, provoque des coupures décalées au niveau du site cible et aux extrémités de l'élément transposable. Chacune des extrémités de l'élément est ensuite attachée par ligation à l'une des extrémités saillantes résultant de la coupure décalée. Les étapes suivantes dépendent du mode de transposition en vigueur. La figure 21-23 décrit un tel modèle.

Message Chez les procaryotes la transposition se produit selon au moins deux modes différents. Certains éléments transposables «répliquent» une de leurs copies à un nouveau site et en abandonnent une au site de départ. Dans d'autres cas la transposition se fait par excision du site de départ et réintégration au nouveau site.

Réarrangements provoqués par les éléments transposables

Les éléments transposables induisent à haute fréquence, et dans leur voisinage, la formation de délétions. Elles s'étendent de l'une

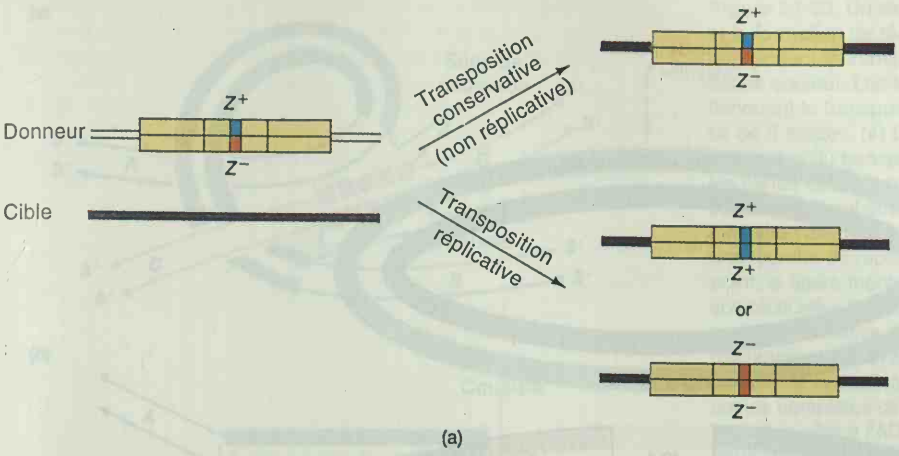
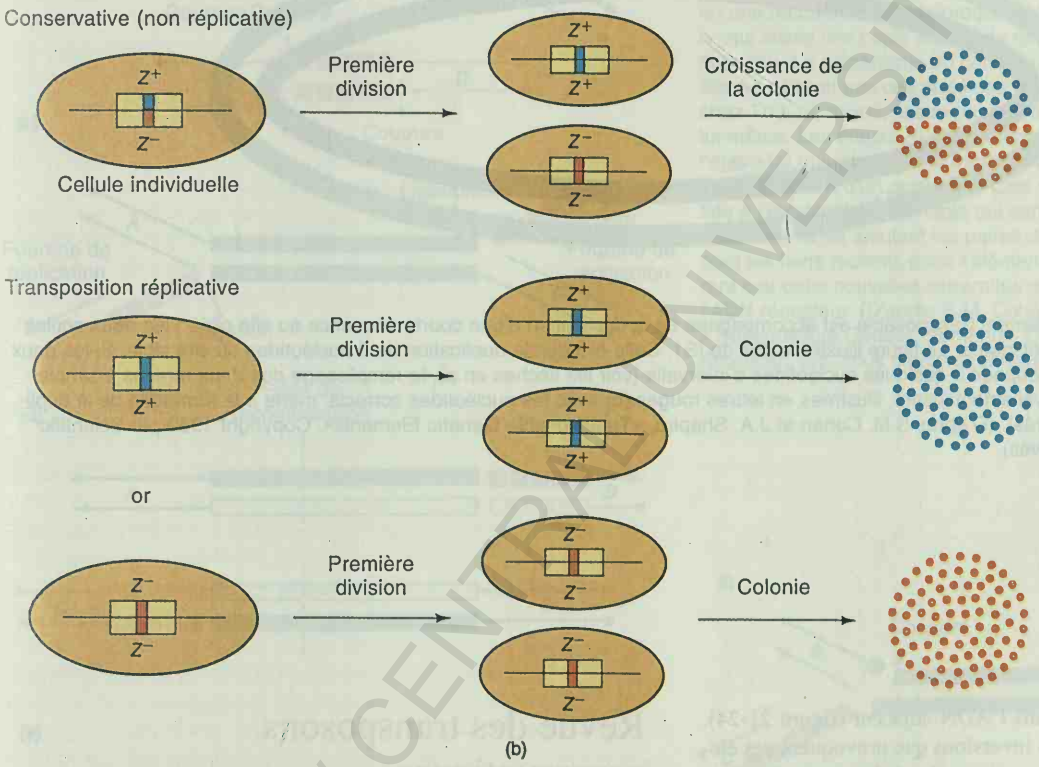


Figure 21-20. Conséquences de la transposition conservative ou réplicative. (a) Les ADN des transposons homo- ou hétéroduplex dans le gène *Z* (voir figure 21-19) sont transposés dans des sites cibles. Si l'ADN est hétéroduplex, il ne le restera lors de la transposition que si celle-ci est conservative (en d'autres termes non réplicative). (b) Si l'ADN transposé est hétéroduplex (cas de la transposition conservative), il y aura formation d'une copie Z^+ et d'une copie Z^- après la réplication de la copie transposée. Les colonies issues des réplications suivantes comporteront des secteurs Z^+ ou Z^-. Si le mécanisme de transposition est réplicatif, la copie transposée à partir de l'ADN hétéroduplex sera déjà soit Z^+ soit Z^- sur ses deux brins et les colonies résultantes seront soit entièrement Z^+ soit entièrement Z^-.



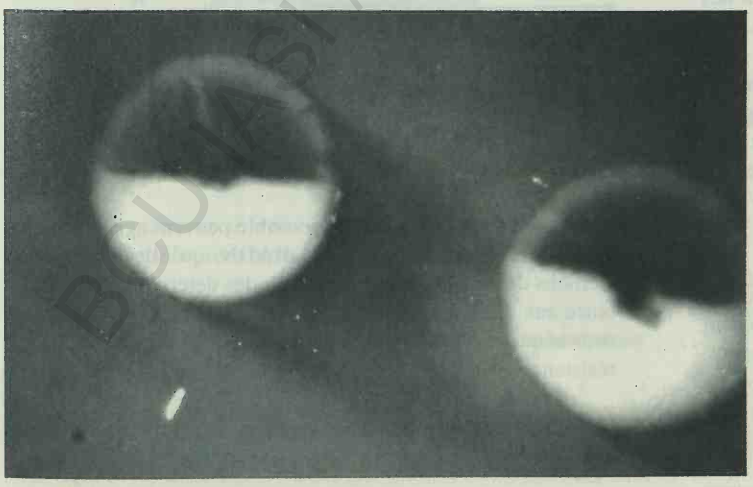


Figure 21-21. Colonies résultant de l'expérience décrite dans les figures 21-19 et 21-20. Le milieu de croissance est additionné d'une substance qui colore différemment les bactéries Z^+ et Z^-. Les colonies photographiées sont pour moitié bleues (Z^+) et pour moitié blanches (Z^-). (Photo fournie par N. Kleckner.)

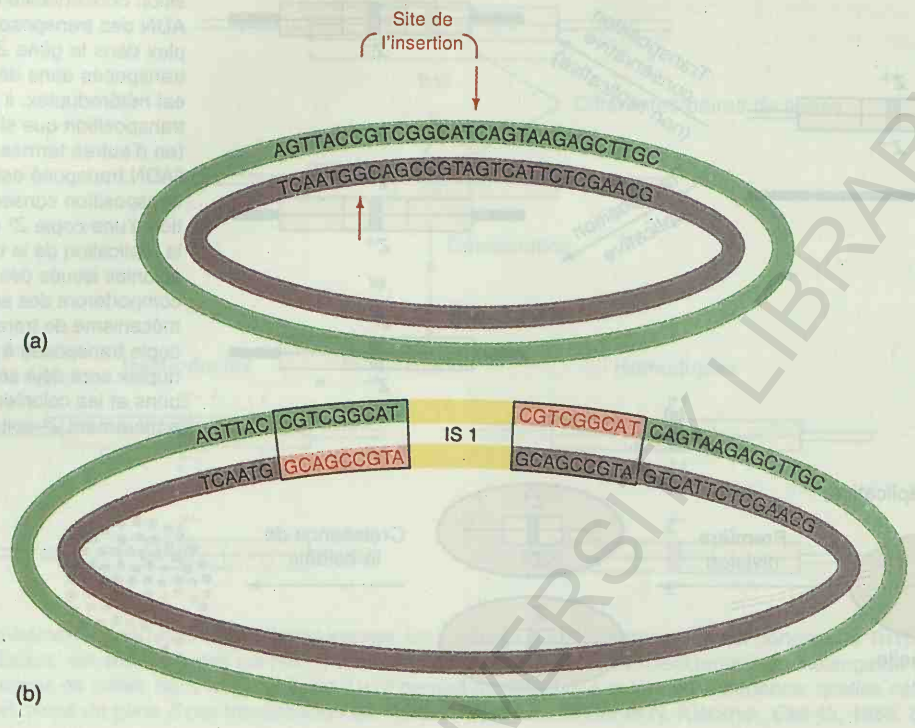


Figure 21-22. L'insertion d'un élément transposable est accompagnée de la duplication d'une courte séquence au site cible ; les deux copies encadrent l'élément nouvellement inséré. La figure illustre le cas de IS1. Celle-ci induit la duplication de 9 nucléotides du site cible. Si les deux fibres de l'ADN récepteur sont coupées à quelques nucléotides d'intervalle (voir les flèches en a), le remplissage des deux régions à simple brin qui flanquent l'élément nouvellement inséré, illustrées en lettres rouges (b),avec les nucléotides corrects, mène à la formation de la duplication (dans les rectangles colorés). (D'après S.M. Cohen et J.A. Shapiro, «Transposable Genetic Elements». Copyright 1980 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés).

des extrémités de l'élément dans l'ADN adjacent (figure 21-24). Ces délétions, de même que les inversions que provoquent ces éléments, peuvent être considérées comme des événements de transposition anormaux. Certains transposons induisent également des délétions qui éliminent une partie du transposon lui-même. Ces **excisions imprécises** sont maintenant considérées comme étant des délétions ou des inversions émanant des extrémités internes des séquences IR du transposon. L'**excision précise** de l'élément, c'est-à-dire sa perte et la restauration de la fonction du gène dans lequel il était inséré, peut aussi se produire. Toutefois ce dernier type d'événement se produit à des fréquences beaucoup plus basses que les précédents.

Message Certaines séquences d'ADN de bactéries et de bactériophages se comportent comme des éléments génétiques mobiles. Elles peuvent fusionner ou dissocier différents segments d'ADN et sont donc en quelque sorte capables d'épisser les molécules d'ADN. Certains éléments mobiles (ou transposables) naturels portent des gènes de résistance aux antibiotiques.

Revue des transposons procaryotiques

Faisons à présent la synthèse de ce que nous avons appris jusqu'ici sur les éléments transposables des procaryotes.

1. Il existe différents types de ces éléments, les séquences d'insertion (IS1, IS2, etc.), les transposons (Tn1, Tn2, etc.) et les phages mutateurs (*Mu*).

2. Deux copies d'un élément transposable peuvent agir de concert pour transposer un segment d'ADN qu'elles encadrent. Certains des transposons qui portent des déterminants de résistance aux antibiotiques sont manifestement de ce type puisque deux séquences d'insertion y encadrent les gènes déterminant la résistance.

3. La plupart des éléments transposables ont, à leurs extrémités, des séquences répétées inversées (IR) caractéristiques.

ROYAL CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

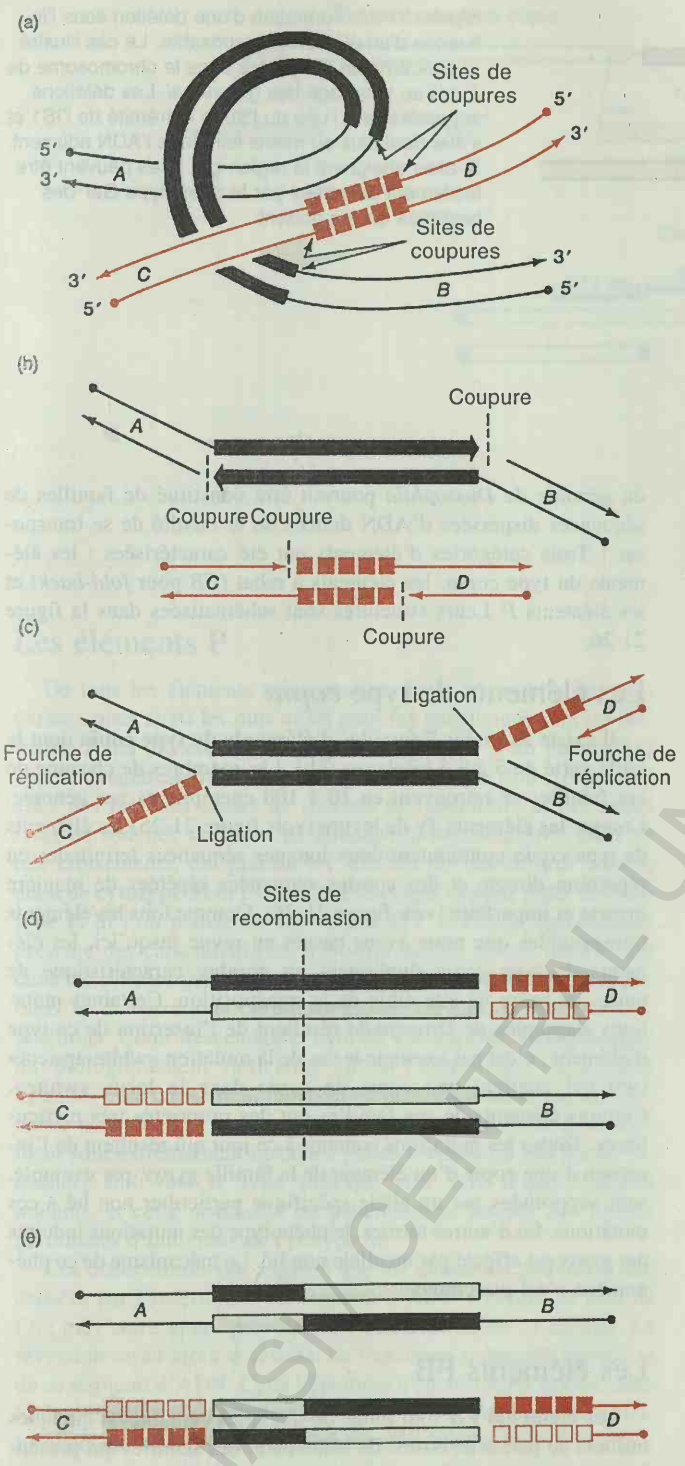


Figure 21-23. Un modèle moléculaire possible pour la transposition et la formation de réarrangements chromosomiques. L'ADN donneur qui contient le transposon (traits épais) est en noir. L'ADN récepteur est en couleur. Les lettres *A, B, C* et *D* marquent les bras d'ADN qui flanquent le transposon et le site cible. Le modèle suppose l'existence de 5 étapes. (a) Des coupures monobrins sont introduites aux extrémités du transposon et de la séquence cible (représentée par les carrés colorés) qui sera dupliquée. Les coupures donnent naissance (b) au substrat de la réaction suivante, la ligature des extrémités de l'élément et du site cible de manière à ce que l'élément ait une fourche de réplication à chacune de ses extrémités (c). A ce point, la figure montre une alternative suivant que la transposition soit réplicative [(d) et (e)] ou conservative [(f) et (g)]. Dans la transposition réplicative, la synthèse d'ADN (d) réplique le transposon (rectangles blancs) et la séquence cible (carrés blancs), ce qui rend compte de la duplication de cette dernière. A ce stade, il y a deux copies complètes de l'élément transposable, liées par un lien covalent, d'un côté à l'ADN donneur, de l'autre à l'ADN récepteur. Les deux copies de l'élément servent de liens pour la recombinaison de deux séquences d'ADN non homologues. L'étape finale (e) consiste en une recombinaison réciproque entre les deux copies de l'élément ce qui laisse une copie au site de départ et en insère une en un site nouveau. Le mécanisme de cette recombinaison n'est pas connu ; elle ne dépend pas des protéines de la recombinaison homologue ; chez Tn3, au moins, elle requiert des séquences propres à l'élément lui-même. Les étapes (f) et (g) montrent une autre issue possible à l'étape (c) qui résulte en la transposition conservative de l'élément sans formation d'un cointégrat. Ceci se produit si la réplication initiée à l'extrémité du site cible qui sert d'amorce à la synthèse, répare la fourche en ajoutant les paires de bases manquantes, en coupant les liens restants entre l'élément et l'ADN donneur et en ligaturant ces deux nouvelles extrémités de l'élément au second brin de l'ADN récepteur. (D'après S.M. Cohen et J.A. Shapiro, «Transposable Genetic Elements» Copyright © 1980 by Scientific American, Inc. Tous droits réservés.)

Certaines peuvent se voir au microscope électronique après dénaturation et renaturation de segments d'ADN qui les contiennent.

4. On trouve des éléments transposables dans les chromosomes bactériens et dans les plasmides.

5. Lorsqu'ils s'insèrent à un site nouveau, les éléments transposables provoquent, en ce site, la formation d'une courte séquence répétée (par exemple, de 9 ou de 5 paires de bases).

6. La transposition peut suivre deux voies. Certains éléments utilisent un mécanisme de transposition *réplicative* au cours duquel une copie de l'élément s'insère au nouveau site alors qu'une autre copie reste au site d'origine. D'autres s'insèrent en un site nouveau sans se répliquer et disparaissent de leur site initial. Cette deuxième voie est connue sous le nom de transposition *conservative*.

BU MASS CENTRAL

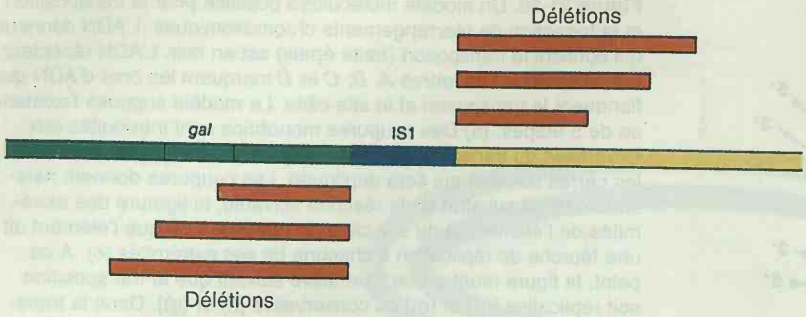


Figure 21-24. Formation d'une délétion sous l'influence d'un élément transposable. Le cas illustré ici concerne un IS1 inséré dans le chromosome de *E.coli* au voisinage des gènes *gal*. Les délétions apparaissent à l'une ou l'autre extrémité de l'IS1 et s'étendent plus ou moins loin dans l'ADN adjacent. Si elles atteignent la région *gal*, elles peuvent être facilement détectées par le phénotype Gal⁻ des bactéries qui les portent.

Certains des éléments transposables trouvés chez les eucaryotes ressemblent à ceux des bactéries : comme chez ces derniers, c'est de l'ADN qui est transposé. Dans d'autres cas cependant, la transposition passe par un intermédiaire en ARN, ce qui rappelle le comportement des rétrovirus décrits chez les mammifères.

Les éléments Ty de la levure

La figure 21-25 décrit la structure de l'un des **éléments Ty** de la levure. Il s'agit de Ty1 dont environ 35 exemplaires se retrouvent dans le génome de cet organisme. L'extrémité, longue d'environ 338 paires de bases, s'appelle la séquence δ et est présente, elle, à environ 100 exemplaires par génome. Les séquences δ de levure, de même que les éléments Ty, divergent par leur séquence nucléotidique. Les séquences δ qui constituent les extrémités des éléments Ty sont répétées en sens direct, ce qui contraste avec les séquences IR, inversées, des transposons bactériens. Comme les éléments mobiles procaryotiques, les Ty provoquent à leur site d'insertion l'apparition d'une courte séquence directement répétée (5pb dans le cas de Ty1). Les Ty provoquent des mutations insertionnelles dans les chromosomes de levure. On sait maintenant que ces éléments se transposent via un intermédiaire ARN (voir la section suivante sur les rétrovirus).

Les éléments transposables de la drosophile

On sait maintenant que, chez la drosophile, une grande partie des mutations et des réarrangements chromosomiques résultent de l'insertion d'un élément transposable. On estime que jusqu'à 10 % du génome de *Drosophila* pourrait être constitué de familles de séquences dispersées d'ADN douées de la faculté de se transposer ! Trois catégories d'éléments ont été caractérisées : les éléments du type *copia*, les éléments à rabat (*FB* pour *fold-back*) et les éléments *P*. Leurs structures sont schématisées dans la figure 21-26.

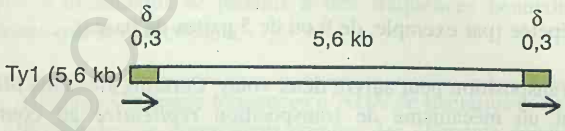


Figure 21-25. Structure d'un élément transposable de levure. La séquence Ty1 est présente dans le génome de levure à environ 35 exemplaires. Elle contient une copie de la séquence delta (δ) à chacune de ses extrémités. Les deux séquences δ sont orientées de la même manière. La séquence δ quant à elle est représentée à plus de 100 exemplaires dans le génome de levure.

Les éléments de type *copia*

Il existe au moins 7 familles d'**éléments de type copia** dont la taille varie de 5 à 8,5 kilobases (kb). Les membres de chacune de ces familles se retrouvent en 10 à 100 exemplaires par génome. Comme les éléments Ty de levure (voir figure 21-25) les éléments de type *copia* contiennent deux longues séquences terminales en répétition directe et des courtes séquences répétées de manière inverse et imparfaite (voir figure 21-26). Comme tous les éléments transposables que nous avons passés en revue jusqu'ici, les éléments de type *copia* dupliquent un nombre caractéristique de paires de bases au site cible de la transposition. Certaines mutations classiques de *Drosophila* résultent de l'insertion de ce type d'élément ; c'est par exemple le cas de la mutation «white-apricot» (w^a) qui contient une copie de *copia* dans le locus «white». Certains éléments de ces familles ont des propriétés très particulières. Toutes les mutations connues à ce jour qui résultent de l'insertion d'une copie d'un élément de la famille *gypsy*, par exemple, sont supprimées par un allèle spécifique particulier non lié à ces mutations. En d'autres termes, le phénotype des mutations induites par *gypsy* est affecté par un allèle non lié. Le mécanisme de ce phénomène n'est pas connu.

Les éléments FB

Les **éléments FB** sont longs de quelques centaines à quelques milliers de paires de bases. Ils constituent des familles qui présentent des similitudes mais aussi des différences de séquences. Tous contiennent de longues extrémités en répétition inverse (voir figure 21-26). Parfois ces séquences répétées sont les seuls constituants de l'élément, parfois elles sont séparées par un segment central. Mais dans tous les cas l'élément peut se rabattre sur lui-même lors d'expériences d'autorenaturation de son ADN (d'où son nom). Certaines mutations instables de drosophile sont dues à l'insertion d'éléments de ce type. Elles sont le plus souvent localisées dans les régions de contrôle de l'expression du gène affecté. Les propriétés de certaines des mutations induites par l'insertion de *FB* suggèrent que ce type d'élément peut s'exciser et provoquer des réarrangements chromosomiques à haute fréquence.

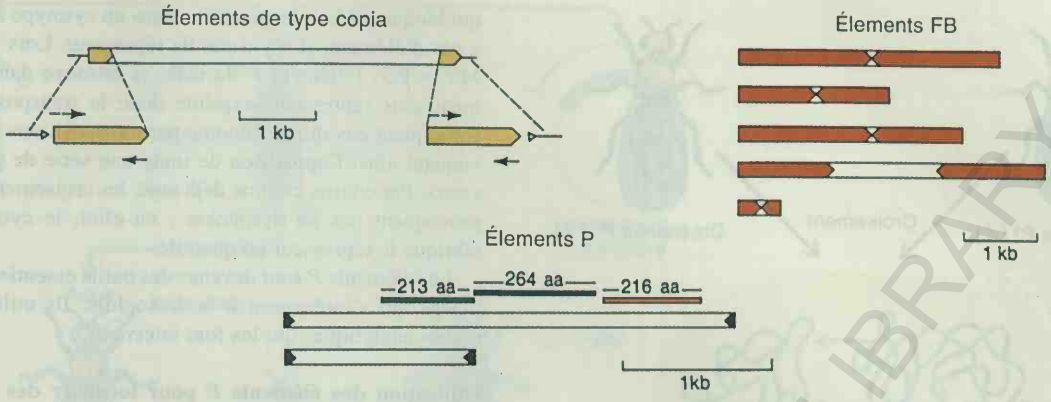


Figure 21-26. Résumé de la structure de trois classes d'éléments transposables de la drosophile. Les éléments de type *copia* portent à leurs extrémités de longues séquences en répétition directe qui représentent chacune 5 % de la longueur de l'élément. Elles sont représentées agrandies (sous l'élément) pour montrer qu'elles contiennent elles-mêmes à leurs extrémités de courtes séquences en répétition inversée (→) et une duplication de la séquence cible (▷) (cette duplication accompagne toujours l'insertion des éléments transposables). Les structures des différents éléments de la famille présents dans le génome sont extrêmement semblables.

La famille des éléments *FB* est très hétérogène. Ils sont longs de quelques centaines à plusieurs milliers de paires de bases mais présentent tous de fortes similitudes de séquence. Chacun de ces éléments porte à ses extrémités de longues séquences répétées inversées. Certains élément *FB* sont uniquement constitués de ces dernières. Dans d'autres, elles sont séparées par un segment central. Les séquences en répétition inversée sont elles-mêmes répétitives ; elles sont essentiellement constituées d'un segment de 31 paires de bases répété en tandem. Le nombre d'exemplaires de ce segment de 31 paires de bases varie non seulement entre différents éléments *FB* mais aussi entre les séquences terminales d'un même élément.

Les éléments *P* sont très différents des éléments de type *copia* et *FB*. Ils portent à leurs extrémités une séquence répétée inversée de 31 paires de bases. Dans une souche de drosophile déterminée, environ 1/3 des éléments *P* sont très semblables ; ils sont longs de 2,9 kb. Les autres éléments de la famille présents dans la souche sont plus courts, de taille hétérogène mais semblent tous dériver de l'élément de 2,9 kb suite à la délétion de différentes parties internes de l'élément. L'analyse de la séquence nucléotidique de l'élément de 2,9 kb a révélé la présence de trois cadres ouverts de lecture qui sont indiqués sur la figure. (D'après G. Rubin, dans *Mobile Genetic Elements*, pp 329-361. Edité par J.A. Shapiro. Copyright © 1983 par Academic Press.)

Les éléments P

De tous les éléments transposables de la drosophile, les plus curieux mais aussi les plus utiles pour les généticiens sont les **éléments *P*.** Ils ont été découverts lors de l'étude d'un phénomène appelé **dysgénèse hybride** qui se produit lorsque l'on croise entre elles des femelles issues de souches de laboratoire et des mâles issus de souches sauvages de *Drosophila melanogaster*. Dans de tels croisements, on qualifie les souches de laboratoires comme étant de **cytotype M** et les souches sauvages comme étant de **cytotype P.** Si l'on réalise un croisement M♀ × P♂, la descendance présente des caractéristiques très surprenantes qui se manifestent dans les cellules germinales : la stérilité, des fréquences de mutations et d'aberrations chromosomiques élevées, et des non-disjonctions. Cette descendance hybride est appelée **«dysgénique»** ou biologiquement déficiente (d'où l'expression «dysgénèse hybride»). Le croisement inverse (P♀ × M♂) produit une descendance normale. Les mutations induites lors de ce type de croisement sont extrêmement instables ; elles réversent à très haute fréquence, soit vers le type sauvage, soit vers d'autres allèles mutants, et cette instabilité est généralement limitée aux lignées germinales d'individus de cytotype M.

Ces observations ont suggéré que les mutations pouvaient être causées par l'insertion d'un segment d'ADN étranger au sein de l'un ou l'autre gène, provoquant l'inactivation de ce dernier. La réversion serait alors le résultat de l'excision spontanée et précise de ce segment d'ADN. Cette hypothèse a été testée en isolant, dans la descendance d'un croisement approprié, des mutants instables, localisés au locus *white*. Un plasmide contenant le locus *white* sauvage a servi à isoler le gène muté. (Ce type d'expérience est décrit dans le chapitre 15.) La majorité des mutations s'avérèrent résulter de l'insertion d'un élément génétique au sein du gène *white*$^+$. Il fut ensuite établi que l'élément, baptisé *P*, était présent en 30 à 50 exemplaires dans les chromosomes des souches de cytotype P mais complètement absent des souches M. L'élément *P* varie en taille (de 0,5 à 2,9 kb) mais les éléments plus courts résultent de la délétion partielle d'un élément *P* complet. Tous ces dérivés possèdent à leurs extrémités des séquences parfaitement répétées, en orientation inverse, longues de 31 paires de bases. Dans la partie centrale, il pourrait y avoir jusqu'à 3 cadres ouverts de lecture, ce qui suggère que l'élément complet code pour trois protéines.

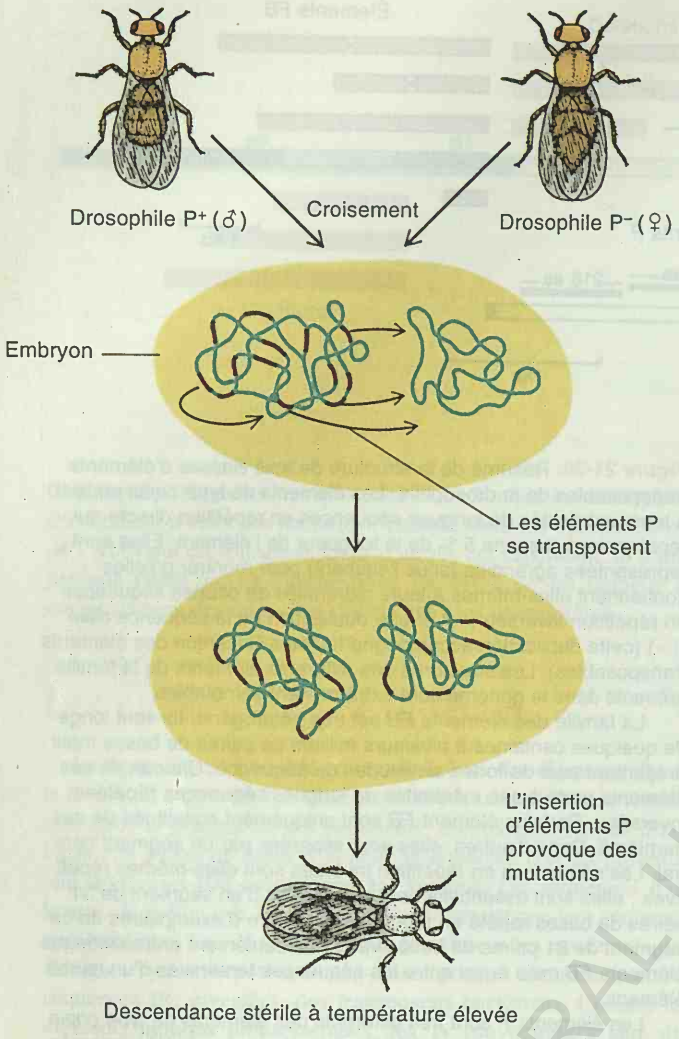


Figure 21-27. Le phénomène de dysgénèse hybride résulte de la mise en mouvement, dans l'embryon de *Drosophila*, d'une séquence d'ADN appelée élément *P*. Quand un spermatozoïde d'une souche qui contient l'élément *P* féconde un œuf d'une souche qui ne le contient pas, l'élément *P* se transpose en de nombreux sites du génome du zygote, ce qui, le plus souvent, mène à l'interruption de certains gènes vitaux. (D'après J.D. Watson, J. Tooze et D.T. Kurtz, *Recombinant DNA : A Short Course*. Copyright © 1983 par W.H. Freeman and Company.)

On explique actuellement la dysgénèse hybride de la manière suivante : l'élément *P* coderait à la fois pour la transposase et pour un répresseur. Le modèle suppose (voir figure 21-27) que la transposase est responsable du déplacement de l'élément, que le répresseur bloque l'expression de la transposase et donc la transposition. (Les propriétés générales des répresseurs sont considérées dans le chapitre 18.) Dans le cytotype P, il y a un grand nombre de copies de l'élément qui synthétisent une grande quantité de répresseur, ce qui bloquerait la transposition. Dans un cytotype M, comme il n'y a pas d'élément, il n'y a pas de répresseur. Lors d'un croisement M♀ × P♂, l'élément *P* du mâle se retrouve dans un environnement sans répresseur, exprime donc la transposase et peut par conséquent envahir le génome par transpositions successives provoquant ainsi l'apparition de toute une série de phénotypes nouveaux. Par contre, comme déjà noté, les croisements P♀ × M♂ ne provoquent pas de dysgénèse ; en effet, le cytotype femelle P fabrique le répresseur en quantité.

Les éléments *P* sont devenus des outils essentiels pour les généticiens qui s'intéressent à la drosophile. Ils utilisent deux techniques analytiques qui les font intervenir.

Utilisation des éléments *P* pour localiser des gènes. Les éléments *P* peuvent être utilisés pour isoler n'importe quel gène intéressant. A la suite d'un croisement dysgénique, on isole d'abord un mutant du gène en question. Comme des vecteurs qui contiennent un fragment de l'élément *P* sont disponibles ils peuvent être utilisés pour repérer et isoler les fragments d'ADN du mutant qui contiennent l'élément (le chapitre 15 donne tous les détails sur ce genre d'expérience). Ils peuvent être clonés et utilisés ensuite pour partir à la pêche au gène sauvage dans une souche non mutée (chapitre 15).

Utilisation d'éléments *P* pour insérer des gènes. La seconde technique importante tire profit d'une découverte faite par Gerald Rubin et Allan Spradling. Ceux-ci ont montré que l'élément *P* peut servir à transférer des gènes dans la lignée germinale d'une mouche femelle. La figure 21-28 décrit le schéma expérimental qu'ils ont suivi. Les mouches réceptrices sont de cytotype M et possèdent un génotype homozygote pour la mutation *rosy* (*ry*⁻), ce qui donne à leurs yeux une couleur rose caractéristique. Des embryons de cette souche sont recueillis au stade d'environ 9 divisions. Ils sont alors constitués d'une cellule multi-nucléée, et les noyaux qui deviendront les cellules germinales sont localisés à l'une de ses extrémités (Les éléments *P* ne s'insèrent que dans les cellules germinales). Deux sortes d'ADN sont ensuite injectés dans ces embryons. Le premier est l'ADN d'un plasmide bactérien qui contient un élément *P* ayant subi une délétion partielle, dans lequel on a cloné un gène *ry*⁺. Cet élément *P* ne peut se transposer à cause de la délétion. Le second ADN contient un élément *P* normal qui fournira la transposase à la copie de *P* contenant la délétion. Les mouches issues de ces embryons ont toujours le phénotype ry⁻, mais dans leur descendance, on retrouve une grande proportion d'individus *ry*⁺. Le gène *ry*⁺ nouvellement acquis montre une hérédité mendélienne et stable, ce qui suggère qu'il est bien localisé sur un chromosome. Ceci se confirme par des expériences d'hybridation in situ qui montrent que le gène *ry*⁺ et l'élément *P* se retrouvent en différentes positions sur différents chromosomes et non à la position normale du locus *rosy*.

Mécanisme de la transposition des éléments P. D'après le modèle représenté sur la figure 21-29 un élément P se transpose en un site nouveau, laissant une rupture dans la double fibre d'ADN à son emplacement original. L'hiatus ainsi crée est encore agrandi par des nucléases. La rupture est réparée grâce à l'élément P présent sur la chromatide soeur ce qui génère deux jonctions de Holliday tout comme dans le modèle avancé pour expliquer la réparation de ruptures de fibres doubles chez la levure (chapitre 20, figure 26). Finalement, après résolution des deux jonctions, chaque chromatide est à nouveau pourvue d'un élément P.

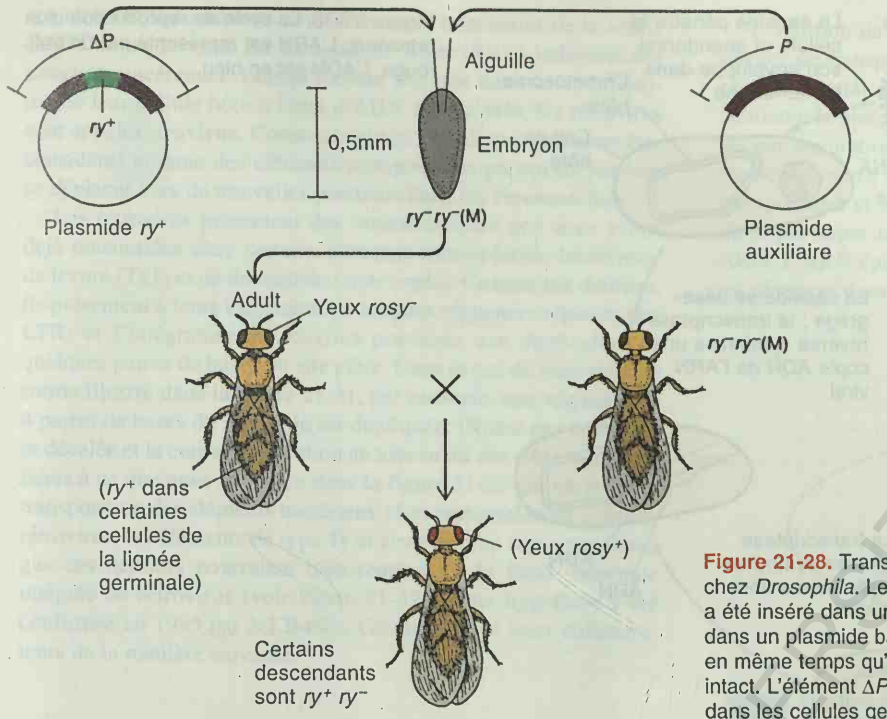


Figure 21-28. Transfert de gène par l'intermédiaire de l'élément *P* chez *Drosophila*. Le gène *rosy*⁺ (*ry*⁺), affectant la coloration de l'œil, a été inséré dans un élément *P* contenant une délétion (Δ*P*) cloné dans un plasmide bactérien. Il a été injecté dans des embryons *ry*⁻ en même temps qu'un autre plasmide contenant un élément *P* intact. L'élément Δ*P* qui contient le gène *ry*⁺ peut alors se transposer dans les cellules germinales.

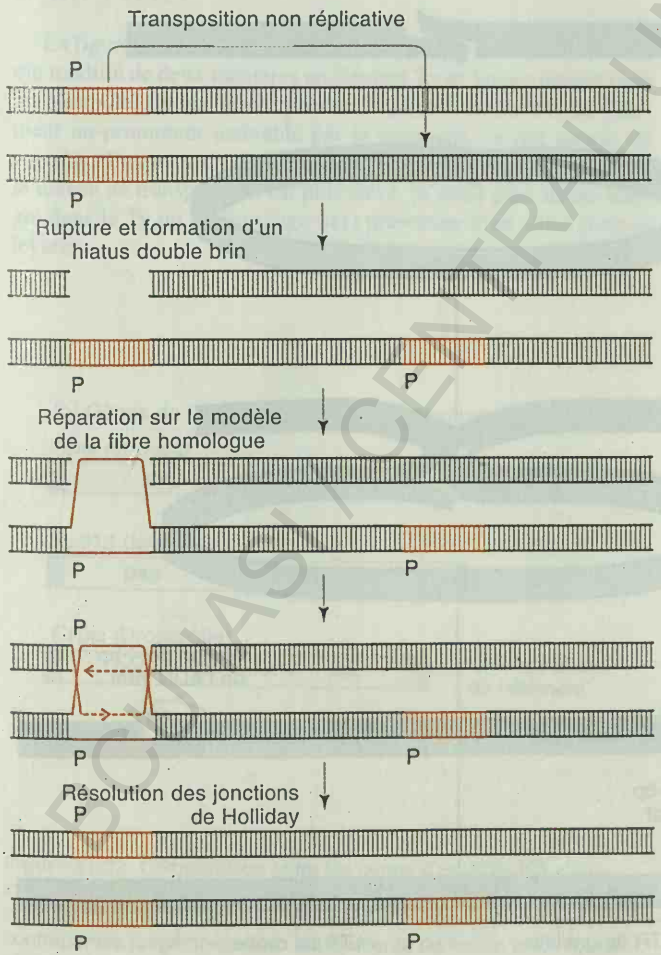


Figure 21-29. Modèle pour la transposition d'un élément P. La transposition d'un élément P laisse au site original une solution de continuité dans les deux fibres qui est réparée sur le modèle de la copie présente dans la chromatide homologue soeur. Ce processus génère deux jonctions de Holliday qui sont ensuite résolues (De William R.Engles, «The origin of P elements in *Drosophila melanogaster*», **Bio Essays**, vol.14 n°10, octobre 1992, pp681-686).

Message Les éléments *P* de *Drosophila* sont des transposons et sont responsables de la dysgénèse hybride. Ils sont doublement utiles pour l'analyse génétique. Ils peuvent être utilisés pour effectuer des mutagénèses et isoler sélectivement des mutants de phénotype particulier. Les éléments *P* peuvent aussi être utilisés pour transférer des gènes spécifiques dans des mouches de génotype donné.

Les rétrovirus

Les **rétrovirus** sont des virus d'animaux dont le génome est constitué d'ARN simple brin et qui utilisent, pour se répliquer, un intermédiaire d'ADN double brin. C'est la transcriptase réverse qui synthétise la copie d'ADN de l'ARN viral. La figure 21-30 schématise le cycle de reproduction d'un rétrovirus. Certains de

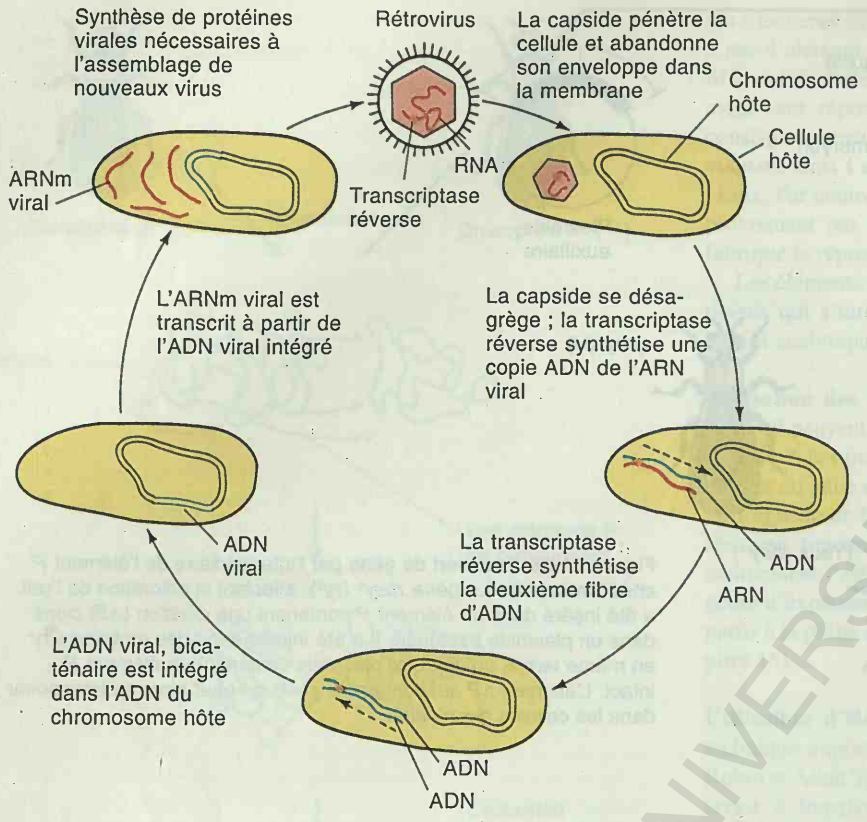


Figure 21-30. Le cycle de reproduction d'un rétrovirus. L'ARN est représenté par un trait rouge. L'ADN est en bleu.

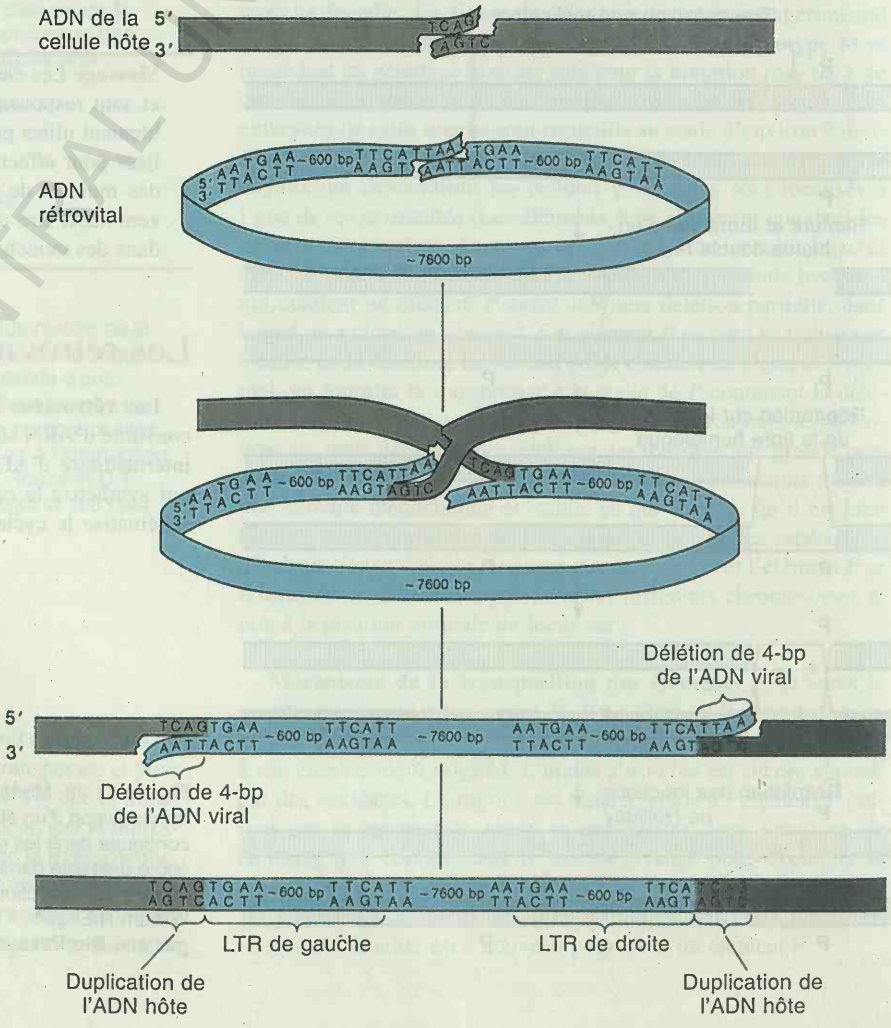


Figure 21-31. Intégration d'une molécule d'ADN double brin circulaire contenant deux séquences LTR en tandem. La figure montre l'intégration de cet ADN dans l'ADN de la cellule hôte au niveau d'une séquence TCAG. L'ADN viral et l'ADN cellulaire subissent tous deux des coupures décalées. Il s'agit, dans le cas représenté, de l'ADN d'un rétrovirus de souris qui provoque une duplication de 4 paires de bases du site cible. Les autres rétrovirus dupliquent 4 ou 6 paires de bases ; notons aussi qu'il se produit une double délétion de 4 paires de bases dans l'ADN rétroviral. (D'après C. Shoemaker et D. Baltimore. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77, 1980, 3932 dans J. Darnell et al. *Molecular Cell Biology.* Copyright © 1986 par Scientific American Books, New York.)

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ces rétrovirus, comme le virus de tumeur mammaire de la souris (MMTV) ou le virus du Sarcome de Rous (RSV) induisent des tumeurs cancéreuses. Lorsqu'ils sont intégrés dans un chromosome de leur cellule hôte à l'état d'ADN double brin, les rétrovirus sont appelés **provirus.** Comme le phage *Mu,* ils peuvent alors être considérés comme des éléments transposables puisqu'ils peuvent se déplacer vers de nouvelles positions dans les chromosomes.

Les rétrovirus présentent des caractéristiques que nous avons déjà rencontrées chez certains éléments transposables bactériens, de levure (Ty1) et de drosophile (type *copia*). Comme ces derniers, ils présentent à leurs extrémités de longues séquences répétées (les LTR) et l'intégration du provirus provoque une duplication de quelques paires de bases du site cible. Dans le cas du rétrovirus de souris illustré dans la figure 21-31, par exemple, une séquence de 4 paires de bases du site cible est dupliquée. (Notez que la coupure décalée et la courte duplication au niveau du site cible sont similaires à ce que nous avons vu dans la figure 21-22 qui décrivait la transposition des éléments bactériens.) Les ressemblances entre les rétrovirus, les éléments de type Ty et ceux de type *copia* suggèrent que ces derniers pourraient bien représenter la forme provirale intégrée de rétrovirus (voir figure 21-32). Cette hypothèse a été confirmée en 1985 par Jef Boeke, Gérald Fink et leurs collaborateurs de la manière suivante.

Transposition par l'intermédiaire d'un ARN

La figure 21-33 décrit le processus expérimental. Boeke et Fink ont modifié de deux manières un élément Ty de levure intégré dans un plasmide. Ils ont inséré près de l'une des extrémités de l'élément un promoteur activable par le galactose, ce qui permet de contrôler l'expression de l'ARN du Ty. En présence de galactose le niveau de transposition est plus élevé. D'autre part, ils ont intégré dans le Ty un intron (page 411) provenant d'un autre gène de levure.

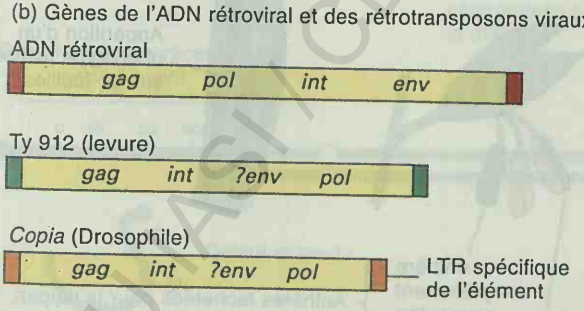


Figure 21-32. Comparaison entre les gènes d'un ADN rétroviral intégré, d'un élément TY de levure et d'un élément copia de drosophile. Les quatre fonctions codées par l'ADN rétroviral ont leurs contreparties respectives dans les éléments de levure et de drosophile représentés ici. Les LTR sont représentés en couleurs à la fin des éléments.

L'addition de galactose provoque une augmentation de la fréquence de transposition de ce nouveau Ty (figure 21-33). Mais le résultat crucial de cette expérience est que les Ty transposés ne contiennent plus l'intron additionnel. Comme les introns sont excisés par maturation de l'ARN (chapitre 13), ceci prouve que l'ARN transcrit à partir du Ty original est bien un intermédiaire dans la transposition et que si le galactose stimule celle-ci, c'est parce qu'il provoque une augmentation du nombre de copies de cet ARN. L'ARN épissé est ensuite transcrit en ADN double brin qui est réintégré dans les chromosomes.

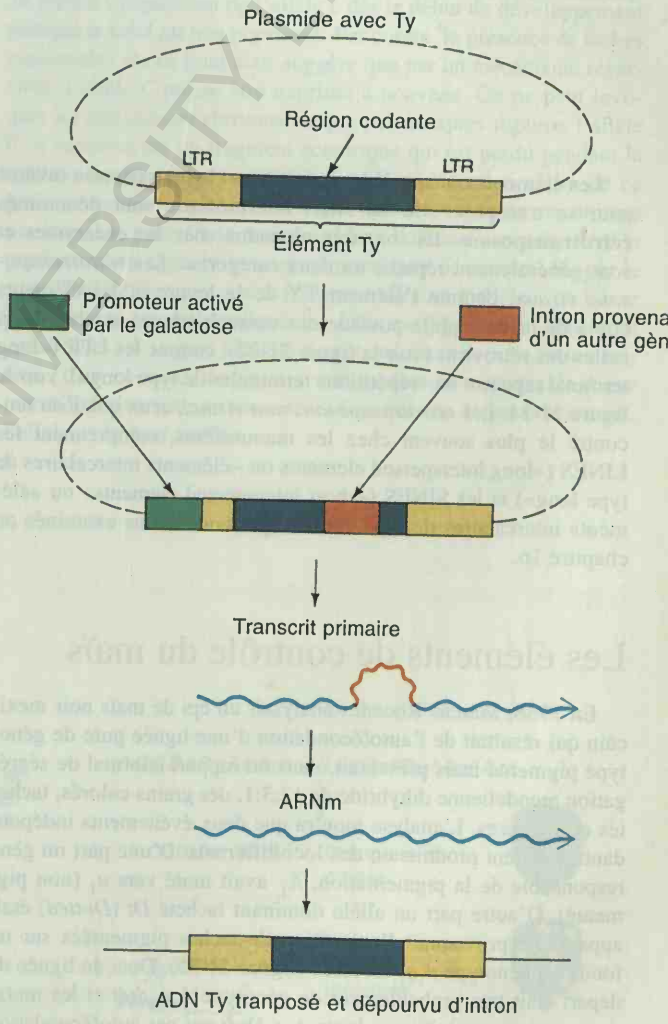


Figure 21-33. Démonstration du passage par un intermédiaire ARN dans la transposition de l'élément Ty. L'élément a été modifié en y insérant un promoteur qui peut être activé par l'addition de galactose. L'activation du promoteur aura pour conséquence directe l'augmentation du taux de transcription du Ty. Un intron provenant d'un gène de levure a aussi été introduit dans l'élément Ty. L'expérience montre que les Ty transposés à partir de ce Ty particulier ne contiennent plus l'intron ce qui prouve que la transposition passe par une forme ARN, la seule qui puisse être le siège d'une excision suivie d'épissage (voir chapitre 13). L'ARN épissé est ensuite rétrotranscrit en ADN et la copie d'ADN s'intègre dans l'ADN chromosomique. (D'après J. Darnell, H. Lodish et D. Baltimore, *Molecular Cell Biology,* p. 450. Copyright © 1986 par Scientific American Books, New York.)

BCU LAUSANNE CENTRE UNIVERSITAIRE IBR

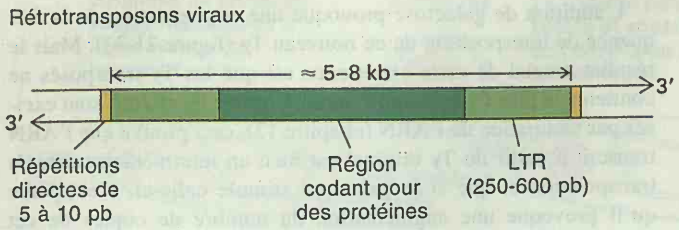


Figure 21-34. Vue schématique d'un rétrotransposon viral. Les éléments de cette catégorie possèdent deux LTR (répétitions terminales de type long) flanquant une région centrale qui code pour des protéines spécifiques.

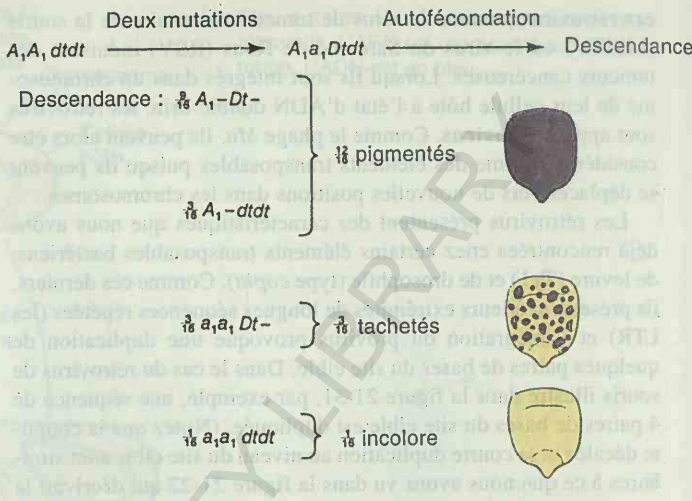


Figure 21-35. Explication formelle de l'apparition d'un phénotype tacheté chez le maïs. Le génotype A_1a_1Dtdt est créé suite à l'apparition simultanée de deux mutations ($A_1 \rightarrow a_1$ et $dt \rightarrow Dt$). Après autofécondation, ce génotype produira le rapport de ségrégation 12 : 3 : 1 observé sur les grains.

Les éléments transposables qui utilisent la transcriptase inverse pour se transposer via un ARN intermédiaire sont dénommés **rétrotransposons.** Ils sont très répandus chez les eucaryotes et sont généralement répartis en deux catégories. Les *rétrotransposons viraux*, comme l'élément TY de la levure et les éléments copia de la drosophile possède des caractéristiques semblables à celles des rétrovirus (voir la figure 21-32), comme les LTR («long terminal repeats» ou «répétitions terminales de type long»), voir la figure 21-34. Les *rétrotransposons non viraux*, ceux que l'on rencontre le plus souvent chez les mammifères, comprennent les LINES («long interspersed elements ou «éléments intercalaires de type long») et les SINES («short interspersed elements» ou «éléments intercalaires de type court») que nous avons examinés au chapitre 16.

Les éléments de contrôle du maïs

En 1938, Marcus Rhoades analysait un épi de maïs noir mexicain qui résultait de l'autofécondation d'une lignée pure de génotype pigmenté mais présentait, dans un rapport anormal de ségrégation mendélienne dihybride de 12:3:1, des grains colorés, tachetés et incolores. L'analyse montra que deux événements indépendants s'étaient produits en des loci différents. D'une part un gène responsable de la pigmentation, A_1, avait muté vers a_1 (non pigmenté). D'autre part un allèle dominant tacheté *Dt* (*Dotted*) était apparu. *Dt* provoquait l'apparition de taches pigmentées sur un fond de phénotype a_1a_1 incolore (figure 21-35). Donc la lignée de départ était très probablement de génotype A_1A_1dtdt et les mutations avaient produit une plante A_1a_1Dtdt qui par autofécondation avait donné le rapport de ségrégation observé.

Mais qu'est-ce qui provoquait le phénotype tacheté ? La possibilité d'une réversion de $a_1 \longrightarrow A_1$ dans les cellules somatiques vient tout de suite à l'esprit mais vu le nombre de taches observées sur les grains, cette réversion devait se produire à très haute fréquence. Rhoades, en utilisant des plantes particulières réussit à trouver des anthères tachetées dans les fleurs de plante a_1a_1Dt (voir figure 21-36). Il en déduisit que ces anthères pouvaient peut-être contenir des grains de pollen porteurs du génotype réverse pigmenté. Il utilisa donc ce pollen pour féconder des femelles a_1a_1. Et comme il l'avait supposé, une partie de la descendance de ce croisement s'avéra être complètement pigmentée.

Ceci démontrait que, dans la plante parentale, chaque tache était la manifestation phénotypique d'un événement de réversion. a_1 était donc un des premiers exemples d'**allèle mutant instable**, à fréquence de réversion très élevée. Toutefois l'instabilité dépend de la présence de l'allèle non lié *Dt*. Les mutations réverses sont stables et l'allèle *Dt* peut être éliminé de la lignée sans que cela n'affecte le caractère A_1. Cette observation peut s'expliquer si le phénotype a_1 est dû à l'insertion d'un élément transposable défectif et donc incapable de se mouvoir de lui-même. En présence d'un facteur fourni en trans par le locus *Dt*, l'élément peut se déplacer, provoquant éventuellement la réversion vers A_1. Cet état reste stable même en l'absence de *Dt*.

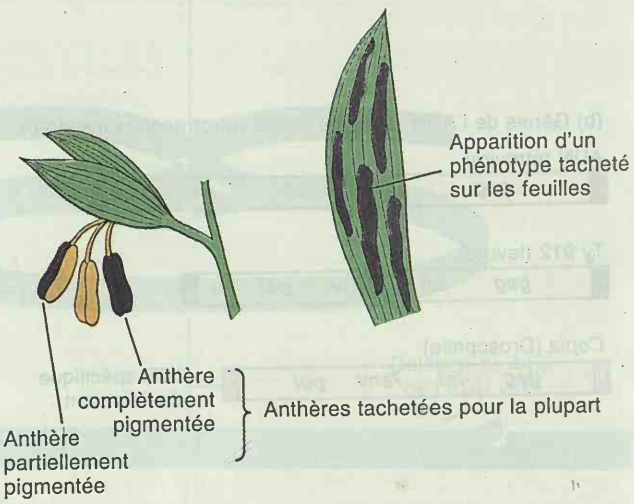


Figure 21-36. Rhoades utilisa des stocks particuliers de plants de maïs de génotype a_1a_1Dt — qui lui permirent de détecter des secteurs colorés dans d'autres tissus que les grains. (D'après M.M. Rhoades, *Genetics* 23 :382, 1938.)

Les expériences de McClintock : l'élément *Ds*

Dans les années '50, toujours chez le maïs, Barbara McClintock observa une situation similaire. Elle découvrit un facteur *Ds* (pour *Dissociation*) qui provoque, à relativement haute fréquence, des ruptures de chromosome à l'endroit où il est localisé. Elles peuvent être détectées par une analyse cytologique (figure 21-37a) ou bien parce qu'elles démasquent des gènes récessifs (figure 21-37b). Remarquez qu'il s'agit de nouveau d'une instabilité génétique. Elle s'avéra dépendre elle aussi de la présence d'un allèle non lié, *Ac* (*Activator*).

McClintock tenta de localiser *Ac* et n'y parvint pas ! Dans certaines plantes, elle le trouvait en un endroit, dans d'autres il était ailleurs. De plus, le locus *Ds* lui aussi changeait continuellement de position (figure 21-37) comme le démontrait un changement de phénotype des sections tachetées (résultant de l'expression de différentes combinaisons de gènes récessifs dans un système tel que celui décrit dans la figure 21-37b).

Dans le contexte de ce chapitre, les tribulations de l'élément *Ds* prennent toute leur signification si l'on considère le résultat du croisement :

$$♂CCDsDsAcAc^{+} \times ♀ccDs^{+}Ds^{+}Ac^{+}Ac^{+}$$

C permet l'expression de la pigmentation et Ds^{+} et Ac^{+} indiquent l'absence de l'élément. La plupart des grains issues de ce croisement ont le phénotype attendu (figure 21-38), mais une graine particulière avait un aspect très intéressant. Comme représenté sur la figure, le premier grain est uniformément coloré grâce à la présence de l'allèle dominant *C*. Le second grain montre un fond de pigmentation interrompu ça et là par des taches non pigmentées suite à la perte de l'allèle *C* par cassure chromosomique dans certaines lignées cellulaires et, par conséquent, à l'expression de l'allèle récessif *c*. Du fait de la nature clonale de la multiplication des cellules de la graine, la dimension de la tache indique si la cassure s'est produite tôt dans le développement (grande tache) ou plus tard (tache plus petite). Le grain représenté au bas de la figure 21-38 reflète l'expression de l'allèle c dès le début du développement puisque le fond est non pigmenté. Par contre, la présence de taches pigmentées sur ce fond clair suggère que par un mécanisme réversible, l'allèle *C* puisse être exprimé à nouveau. On ne peut invoquer ici une cassure chromosomique puisqu'après rupture, l'allèle C se retrouve sur un fragment acentrique qui est perdu pendant la mitose, ce qui exclut toute réversion. La coloration claire de ce grain particulier résulte en fait d'une deuxième type de mécanisme par lequel le gène *Ds* se transpose dans l'allèle *C*, ce qui arrête la production de pigment, mais sans provoquer de cassure. Si, par la suite, l'allèle *Ds* est excisé et transposé ailleurs, l'allèle *C* recouvre sa fonction, ce qui explique les cellules pigmentées dont sont constituées les taches. L'allèle *Ac* est aussi requis pour cette excision ; dans ce cas-ci il agit donc comme facteur responsable d'une instabilité réversible au locus *C*. Si l'on élimine *Ac* par croisement, l'allèle c^{r} devient stable.

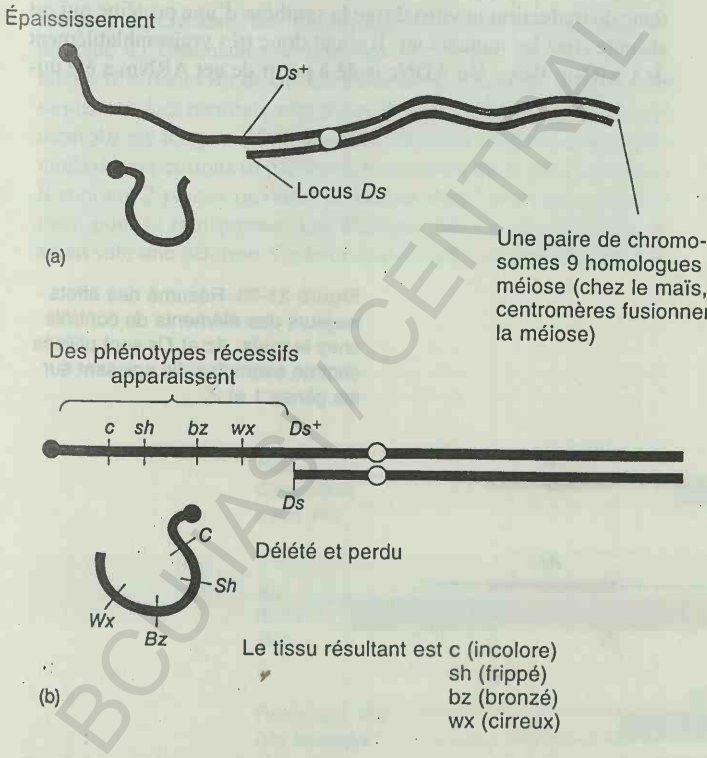


Figure 21-37. Détection de cassures chez des chromosomes de maïs (instabilité) résultant de l'activité de l'élément *Ds*. (a) Détection cytologique de la cassure. (Ds^{+} indique l'absence de l'élément *Ds*.) (b) Détection génétique de la cassure.

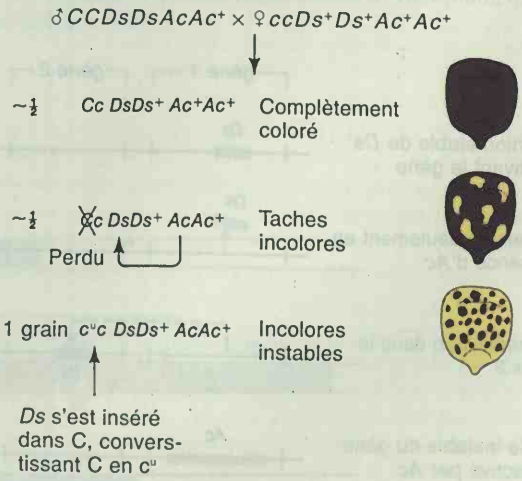


Figure 21-38. Résultats reflétant la transposition de *Ds* dans le gène *C* du maïs. (*C* produit un phénotype coloré ; *c* non. *Ac* = activateur). L'activité de *Ds* dépend de la présence du gène non lié *Ac*.

BCCAST / CENTRAL UNIVERSITY

L'analogie avec le système a_1 *Dt* est frappante et l'on peut dès lors se demander d'une part, si un élément de type *Ds* ne s'était pas intégré dans le locus A_1 décrit précédemment, et d'autre part, si a_1 ne répondait pas à *Ac* et c^u à *Dt*. La réponse est non. Il existe donc une spécificité qui empêche l'activation croisée de l'instabilité.

Le locus wx (waxy, «cireux»)

L'élément *Ds* peut s'installer dans le gène *C* mais aussi dans d'autres gènes. Les mutants ainsi obtenus deviennent à leur tour instables lorsqu'ils sont mis en présence de *Ac*. Le locus *wx* du maïs a été très étudié. Oliver Nelson a isolé de nombreux allèles instables de *waxy* et les a croisés entre eux en absence de *Ac*. Dans des hétérozygotes $wx^{m\text{-}1}/wx^{m\text{-}2}$, il a recherché les rares recombinants de type sauvage *Wx*, en colorant les grains de pollen au réactif KI-I_2 qui rend les grains sauvages noirs et les grains *wx* rouges. En mesurant la fréquence d'apparition de grains de pollen *Wx* dans chaque type d'hétérozygote, Nelson put établir une carte du gène *waxy* et montrer que différents allèles *waxy* instables résultent de l'insertion de *Ds* en différents endroits du gène. Il fertilisa ensuite des plantes *wx* par du pollen contenant ces rares recombinants *Wx* et récupéra les rares graines *Wx* issues de ce croisement. Il les identifia toujours grâce au même système de coloration pratiqué sur de petits éclats. Ces graines ont donné naissance à des plantes dont les caractéristiques montraient que le pollen Wx résultait bien d'un échange entre chromosomes pourvus de marqueurs situés de part et d'autre de la mutation.

Caractéristiques générales des éléments de contrôle

Différents systèmes du même type que a_1*Dt* et *DsAc* sont aujourd'hui connus chez le maïs. Ils agissent de la même manière : un **gène cible** est inactivé, probablement par insertion d'un **élément récepteur,** qui est rendu instable par l'activité d'un autre locus, le **gène régulateur,** qui peut probablement provoquer l'excision de l'élément récepteur de son site et par là restaurer l'activité du gène cible. Le récepteur et le gène régulateur sont appelés **éléments de contrôle.**

Dans les exemples que nous venons de passer en revue, l'allèle instable est qualifié de **non autonome,** car il ne réverse qu'en présence du régulateur. Parfois cependant un système tel que *DsAc* peut produire des allèles instables **autonomes.** Ceux-ci montrent une ségrégation mendélienne typique (3 : 1 par exemple pour la pigmentation totale et la présence de taches) même en l'absence d'un autre élément. De tels allèles semblent résulter de l'insertion, dans le gène cible, de l'élément *Ac* lui-même. L'allèle autonome peut ensuite se transformer en allèle non autonome et dans ce cas, l'élément *Ds* semble dériver directement de l'élément *Ac*, ce qui suggère que *Ds* serait simplement un élément *Ac* dégénéré.

La figure 21-39 résume le comportement des éléments de contrôle du maïs tels que déduits de l'analyse génétique. Il explique très bien les résultats initiaux de Rhoades : un élément non autonome semblable à *Ds* serait dérivé d'un ancêtre comparable à *Ac*. La transposition de l'élément de type *Ds* dans le gène A_1 aurait produit l'allèle muté instable a_1.

Analyse moléculaire des éléments de contrôle

Les études moléculaires réalisées ces dernières années sur les éléments de contrôle du maïs ont vérifié les prédictions de McClintock de manière très satisfaisante. Ces études ont été réalisées sur des mutants *waxy* instables, induits par le système *DsAc*. Un ARNm a pu être identifié dans l'endosperme qui dans un système de traduction in vitro dirige la synthèse d'une protéine qui est absente chez les mutants *wx*. Il s'agit donc très vraisemblablement de l'ARNm *Waxy*. Un ADNc isolé à partir de cet ARNm a été uti-

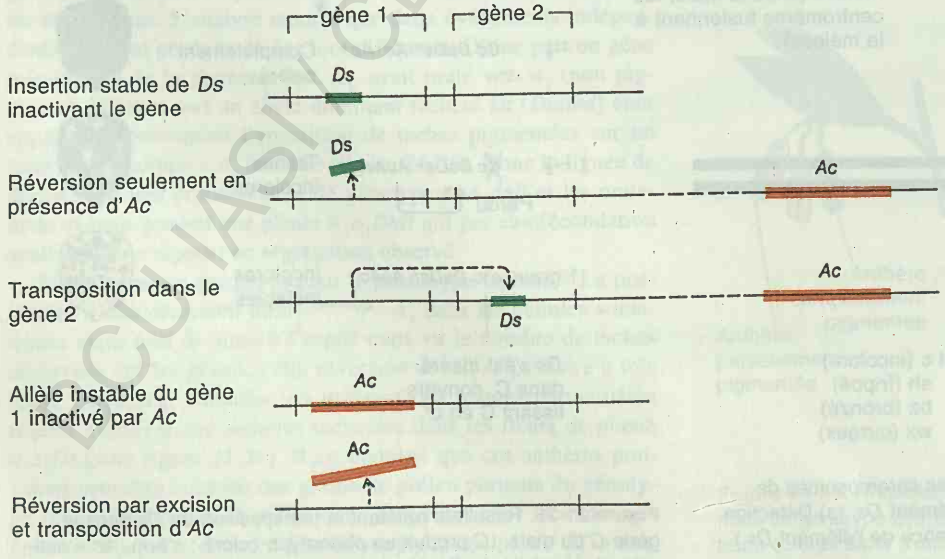


Figure 21-39. Résumé des effets majeurs des éléments de contrôle chez le maïs. *Ac* et *Ds* sont utilisés comme exemples. Ils agissent sur les gènes 1 et 2.

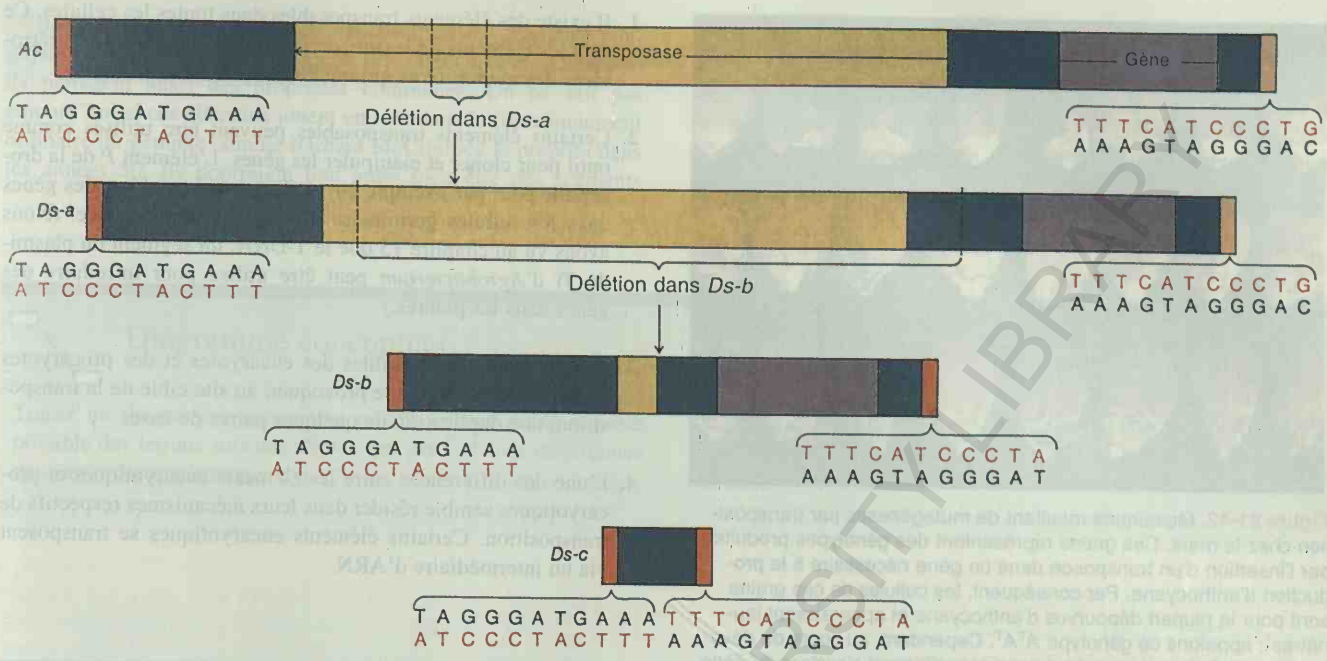


Figure 21-40. Structure de l'élément *Ac* et de différents éléments *Ds*. (D'après N.V. Federoff, «Transposable Genetic Elements in Maize.» Copyright © 1984 par Scientific American, Tous droits réservés.)

lisé pour repérer dans une librairie génomique de Maïs le gène *Wx*, un gène *wx* contenant une insertion soit de *Ds*, soit de *Ac* et des allèles révertants *Wx* de ces allèles instables. Tous ces ADN ont été séquencés. Les résultats sont résumés dans la figure 21-40. Un élément *Ac* est long de 4500 paires de bases et contient à ses extrémités des répétitions imparfaites et inversées de 11 paires de bases. Il contient 2 phases ouvertes de lecture dont l'une code probablement pour la transposase. Les éléments *Ds* sont des éléments *Ac* ayant subi une délétion. Celle-ci couvre tout ou partie du gène présumé coder pour la transposase et peut être courte, comme dans *Ds-a*, ou longue comme dans *Ds-b* et *Ds-c* (figure 21-40).

De part et d'autre de l'insertion du transposon, on voit une duplication de 8 paires de bases du gène *Wx*. Cette duplication est souvent imparfaite. Lors de l'excision de l'élément, la duplication subsiste mais est souvent modifiée de manière à restaurer la phase de lecture du gène. Ces duplications sont décrites dans la figure 21-41. *Ac* se transpose probablement à l'état d'ADN plutôt que par un intermédiaire ARN.

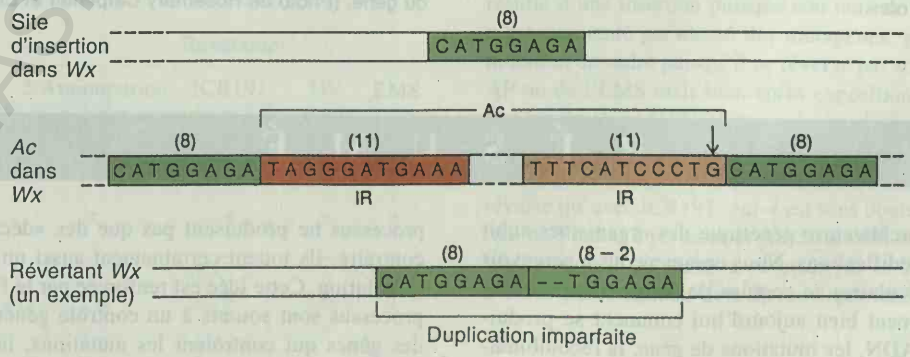


Figure 21-41. Duplication au site cible dans le gène *waxy* du maïs occasionnée par la transposition de l'élément *Ac*.

Figure 21-42. Mosaïques résultant de mutagénèses par transposition chez le maïs. Ces grains représentent des génotypes produits par l'insertion d'un transposon dans un gène nécessaire à la production d'anthocyane. Par conséquent, les cellules de ces grains sont pour la plupart dépourvus d'anthocyane et apparaissent jaunâtres ; appelons ce génotype A^TA^T. Cependant, au cours du développement, le transposon peut occasionnellement s'exciser du gène, ce qui produit un révertant de génotype AA^T. Des divisions successives formeront un clone de cellules révertantes prenant l'aspect d'une tache pigmentée. Les trois rangées représentent respectivement des grains où le transposon s'est excisé tôt (grandes taches), tard (petites taches) ou à un stade intermédiaire (taches de dimensions intermédiaires).

Message Les éléments de contrôle du maïs peuvent inactiver le gène dans lequel ils s'insèrent, provoquer des ruptures de chromosomes, et se transposer. Les éléments complets peuvent provoquer ces événements de manière autonome. Les éléments devenus défectifs suite à des délétions d'une partie de leur ADN, ne le peuvent qu'en présence d'un élément complet localisé ailleurs dans le génome. Les figures 21-42 et 21-43 représentent des exemples d'effets phénotypiques de transpositions chez le maïs et le muflier.

Revue des transposons eucaryotiques

Voyons les caractéristiques essentielles des éléments transposables chez les eucaryotes.

1. Il existe des éléments transposables dans toutes les cellules. Ce sont les éléments de levure, de drosophile, de maïs et les rétrovirus des mammifères qui ont été les plus étudiés.

2. Certains éléments transposables peuvent être utilisés comme outil pour cloner et manipuler les gènes. L'élément *P* de la drosophile peut par exemple être utilisé pour transférer des gènes dans les cellules germinales d'une mouche réceptrice. (Nous avons vu au chapitre 15 que le T-DNA, un segment du plasmide Ti d'*Agrobacterium* peut être utilisé pour introduire des gènes dans les plantes.)

3. Les éléments transposables des eucaryotes et des procaryotes partagent la propriété de provoquer, au site cible de la transposition, une duplication de quelques paires de bases.

4. L'une des différences entre les éléments eucaryotiques et procaryotiques semble résider dans leurs mécanismes respectifs de transposition. Certains éléments eucaryotiques se transposent via un intermédiaire d'ARN.

Figure 21-43. Mosaïque résultant de mutagénèses par transposition chez le muflier (*Antirrhinum*). Comme dans l'exemple du maïs (figure 21-42) la plante possède deux copies d'un gène nécessaire à la synthèse d'anthocyane mais inactivé par un transposon, ce qui produit du tissu albinos. Des secteurs révertants (taches ou rails rouges) apparaissent lorsque le transposon s'excise spontanément du gène. (Photo de Rosemary Carpenter et Enrico Coen).

RÉSUMÉ

Dans la nature l'architecture génétique des organismes subit différents types de modifications. Nous commençons à percevoir les mécanismes moléculaires de certains de ces processus. Nous comprenons relativement bien aujourd'hui comment se produisent, au niveau de l'ADN, les mutations de gène, la recombinaison (discutées dans les chapitres 19 et 20) et la transposition. Ces processus ne produisent pas que des «déchets génétiques». Au contraire, ils jouent certainement aussi un rôle primordial dans l'évolution. Cette idée est renforcée par le fait que certains de ces processus sont soumis à un contrôle génétique raffiné. Ce sont des gènes qui contrôlent les mutations, la recombinaison et la transposition.

Bien que les mécanismes de transposition des éléments phagiques, bactériens et eucaryotiques présentent des particularités, ils partagent aussi des propriétés communes. On ne sait pas aujourd'hui si ces éléments jouent un rôle dans le fonctionnement ordinaire du génome comme Barbara McClintock le proposa dans les années 50. Ils pourraient tout aussi bien être des segments d'ADN «égoïstes» pour qui seule compte leur propre survie. Quoiqu'il en soit les transposons introduisent dans les génomes une composante chaotique que les généticiens ont apprivoisée en techniques analytiques. Certains sauts évolutifs que révèle l'étude des fossiles pourraient bien résulter de l'activité soudainement accrue de transposons.

Diagramme conceptuel

Tracez un diagramme conceptuel reliant le plus grand nombre possible des termes suivants. Notez que ceux-ci sont mentionnés dans un ordre quelconque.

Elément IS / plasmides / transposons / répétitions inversées / réarrangements / phénotype / marquage / mutations instables / secteurs.

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Nous avons étudié le modèle de l'opéron au chapitre 18. Notons que l'ordre de transcription des gènes de l'opéron *gal* (galactose) est *E-T-K*. Supposons que nous disposions de cinq mutations dans *galT* : *gal-1*, *gal-2*, *gal-3*, *gal-4* et *gal-5*. Le tableau suivant montre comment *galE* et *galK* s'expriment chez ces différents mutants.

mutation galT	Expression de galE	Expression de galK
gal-1	+	–
gal-2	+	–
gal-3	+	–
gal-4	+	+
gal-5	+	+

En outre, les modes de réversion de ces mutations par certains des mutagènes dont nous avons parlé au chapitre 19 sont indiqués dans le tableau ci-dessous. Un «+» indique un taux de réversion élevé, un «-» pas de réversion et «±» un taux relativement bas

	Réversion				
Mutation	Spontanée	2-Aminopurine	ICR191	UV	EMS
gal-1	–	–	+	+	–
gal-2	–	–	+	–	–
gal-3	±	±	±	±	±
gal-4	–	–	–	–	–
gal-5	±	+	±	+	+

Laquelle de ces mutations est-elle vraisemblablement due à l'insertion d'un élément transposable tel qu'IS1 ? Pourquoi ? Quel est votre diagnostic pour les autres mutations ?

Solution

Les éléments transposables exercent un effet polaire, empêchant ou diminuant l'expression des gènes situés en aval du point d'insertion mais non celle des gènes localisés en amont. Dès lors, nous nous attendons à ce qu'une insertion dans *galT* fasse obstacle à l'expression de *galK*. Trois mutations montrent cet effet à savoir, *gal-1*, *gal-2* et *gal-3*. Mais un effet polaire pourrait aussi résulter d'une mutation de cadre de lecture (ou glissement de phase) ou d'une mutation non-sens. Ce sont les données de réversion qui nous permettent de distinguer. Les mutations dues à des éléments transposables réversent à des taux faibles de manière spontanée et ces taux ne sont pas accrus par les analogues de base, les mutagènes générateurs de glissement de phase, les agent alkylants ou les UV. D'après ces critères, il semble très probable que *gal-3* résulte d'une insertion puisque son taux de réversion est faible et n'est augmenté par aucun des mutagènes. *gal-1* pourrait être une mutation de cadre puisqu'il ne réverse pas sous l'influence de la 2-AP ou de l'EMS mais bien après exposition au mutagène de glissement de phase ICR191 ou après irradiation par les UV. (Voir le chapitre 19 pour plus de détails concernant ces mutagènes). De même, *gal-2* est probablement une mutation de cadre puisqu'il ne réverse qu'avec ICR191. *gal-4* est sans doute une délétion puisque rien ne l'induit à réverser et *gal-5* ssemble être une substitution de base puisqu'il est induit à réverser par la 2-AP mais qu'ICR191 n'élève pas le taux au-delà du taux spontané.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PROBLÈME RÉSOLU

1. Les éléments transposables sont souvent appelés «gènes sauteurs» parce qu'ils semblent pouvoir sauter d'une position sur un chromosome vers une autre, quittant leur ancienne position et se retrouvant ailleurs. Etant donné les connaissances que nous avons actuellement du mécanisme de la transposition, pensez-vous que ce terme de gènes sauteurs est approprié pour les éléments transposables des bactéries ?

Solution

Chez les bactéries, la transposition peut se faire selon deux voies. Le mode conservatif implique effectivement le saut de l'élément d'une position vers une autre. Il s'excise de sa position initiale et se réinsère en une position nouvelle. Par contre il existe un second mode de transposition, réplicatif celui-là, au cours duquel l'élément se réplique en un nouveau site en abandonnant une copie au site d'origine. Dans ce cas-là le terme gène sauteur n'est pas vraiment approprié puisque l'élément ne s'excise pas de son site initial d'insertion.

PROBLÈMES

1. Supposons que vous désiriez déterminer si une nouvelle mutation dans l'opéron *gal* de *E.coli* résulte de l'insertion d'une séquence d'ADN. Décrivez deux expériences physiques qui vous permettraient de démontrer la présence d'une insertion.

2. Qu'est-ce qu'une mutation polaire ?

3. Expliquez les différences qui existent entre les modes de transposition réplicative et conservative. Décrivez brièvement une expérience qui permettrait de démontrer l'existence de ces deux modes chez les procaryotes.

4. Décrivez comment se forment les plasmides qui portent de multiples facteurs de résistance.

5. Décrivez brièvement l'expérience qui a permis de démontrer le fait que le transposon Ty se transpose par l'intermédiaire d'un ARN.

6. Expliquez pourquoi les propriétés de l'élément *P* de *Drosophila* en font un outil de choix pour effectuer des transferts de gènes chez cet organisme.

7. Lorsque Rhoades utilisa du pollen d'anthères complètement colorées de plantes de génotype a_1a_1DtDt pour polliniser des testeurs femelles a_1a_1dtdt, il obtint des épis complètement colorés mais aussi de rares épis tachetés. Expliquez l'origine des *deux* phénotypes.

8. Chez la levure, la région *his4* contient trois cistrons, A, B et C, dans cet ordre, chacun d'entre-eux contrôlant une étape de la biosynthèse de l'histidine. Une mutation particulière est localisée dans le cistron A mais elle inactive les trois cistrons (A, B et C). La mutation n'est pas supprimée par les suppresseurs d'ambre ou de phase. Elle réverse relativement fréquemment mais sa fréquence de réversion n'est pas modifiée par les mutagènes quels qu'ils soient. Discutez la nature de cette mutation.

9. Chez la drosophile, M. Green isola l'allèle flambé («singed») *sn77-27* qui possède des caractéristiques particulières. Les femelles homozygotes pour cet allèle ont sur la tête, le thorax et l'abdomen des soies «flambées» mais aussi des plaques de soies normales (sn^+). Lorsqu'elles sont croisées avec des mâles *sn*, certaines de ces femelles donnent une descendance entièrement «flambée» mais d'autres donnent un mélange de descendants «flambés» et sauvages en proportion variable. Expliquez ces résultats.

10. La galle du collet, appelée «crown-gall», se rencontre chez de nombreuses plantes dicotylédones infectées par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Elle résulte de l'insertion dans l'ADN de la plante infectée d'un fragment d'ADN contenu dans un grand plasmide de la bactérie. Un plant de tabac de type A (il y a de nombreuses espèces de tabac) est infecté et produit des tumeurs. Vous prélevez une tumeur et mettez en culture dans un milieu synthétique les cellules qu'elle contient. Certaines de ces cellules produisent des pousses. Vous greffez une de ces pousses sur un plan de tabac de type B et le greffon se développe en une plante en apparence de type A normal.

a. Vous prélevez des cellules du greffon et les mettez en culture sur un milieu synthétique sur lequel elles se développent comme des cellules tumorales. Expliquez pourquoi le greffon avait une apparence normale.

b. Lorsque le greffon produit des graines, les plantes qui se développent à partir de celles-ci sont des plantes de type A normal. Il ne reste plus de trace de l'ADN inséré du plasmide. Proposez une explication pour cette «réversion».

11. Considérons les plants de maïs suivants :

a. l'un de génotype Cc^mAc^+ où c^m est un allèle instable résultant de l'insertion d'un élément *Ds*.

b. l'autre de génotype Cc^m où c^m est un allèle instable résultant de l'insertion d'un élément *Ac*.

Quels seront les phénotypes produits, et dans quelles proportions, lorsque (1) chacune de ces plantes est croisée avec un mutant *cc* résultant de la substitution d'une seule paire de base, (2) la plante (a) est croisée avec la plante (b) ? Supposez que *Ac* et *c* ne sont pas liés, que la fréquence de cassure des chromosomes est négligeable et que le mutant *cc* est Ac^+

CHAPITRE

22

Le génome extranucléaire

Panachures foliaires chez *Euonymus fortunei* dues à la ségrégation pendant les divisions cellulaires de deux types d'ADN chloroplastique, l'un normal, l'autre provoquant la formation de tissu albinos. La ségrégation produit des feuilles panachées ou, plus rarement, des branches entièrement vertes ou entièrement blanches. (Anthony Griffiths)

CONCEPTS-CLÉS

- Les chloroplastes et les mitochondries contiennent chacun de multiples copies de leur propre chromosome.
- L'ADN des organites — et tout phénotype mutant encodé dans sa structure — est généralement transmis par le parent maternel.
- Lorsque deux ADN mitochondriaux ou chloroplastiques génétiquement différents sont associés dans la même cellule, celle-ci produit généralement des descendants qui n'en contiennent plus qu'un seul.
- Il est possible de détecter des recombinaisons génétiques entre organites «dihybrides».
- Les gènes d'organites codent pour des éléments impliqués dans les processus de traduction ou de transcription qui leur sont propres, ou encore pour des éléments des systèmes producteurs d'énergie.
- La plupart des polypeptides codés par les gènes d'organites s'unissent à des polypeptides codés par le noyau pour produire des protéines actives qui exercent leur fonction dans l'organite même.

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

Que le noyau soit le lieu de résidence des gènes par excellence fait partie des idées reçues en génétique. Il n'est d'ailleurs pas question de remettre en cause cette notion de base. Le mécanisme des processus nucléaires que sont la méiose et la mitose et le fait que les chromosomes soient des ensembles de gènes localisés dans le noyau nous fournissent les règles de base de l'analyse génétique. Cependant, comme tous les principes de base, celui de la localisation nucléaire des gènes connaît des exceptions et celles-ci nous occuperont tout au long de ce chapitre. Le mode de transmission de certains gènes eucaryotiques révèle qu'ils se trouvent en dehors du noyau. De tels **gènes extranucléaires** ont été décelés chez les eucaryotes les plus divers. Les modes de transmission propres aux gènes extranucléaires s'observent moins souvent que ceux des gènes nucléaires et d'ailleurs les gènes extranucléaires sont beaucoup moins nombreux que les gènes chromosomiques. Néanmoins, même si on peut les considérer de ce point de vue comme exceptionnels il est devenu clair qu'ils exercent des fonctions normales (bien que très spécialisées) dans le contrôle des phénotypes eucaryotiques.

On trouve les gènes extranucléaires dans les mitochondries et les chloroplastes, deux organites que l'on trouve dans le cytoplasme des cellules eukaryotiques (figure 22-1). Ces organites assurent deux fonctions majeures : la synthèse d'ATP et la photosynthèse, respectivement. Les mitochondries et les chloroplastes contiennent chacun leur jeu propre et bien distinct de gènes autonomes grou-

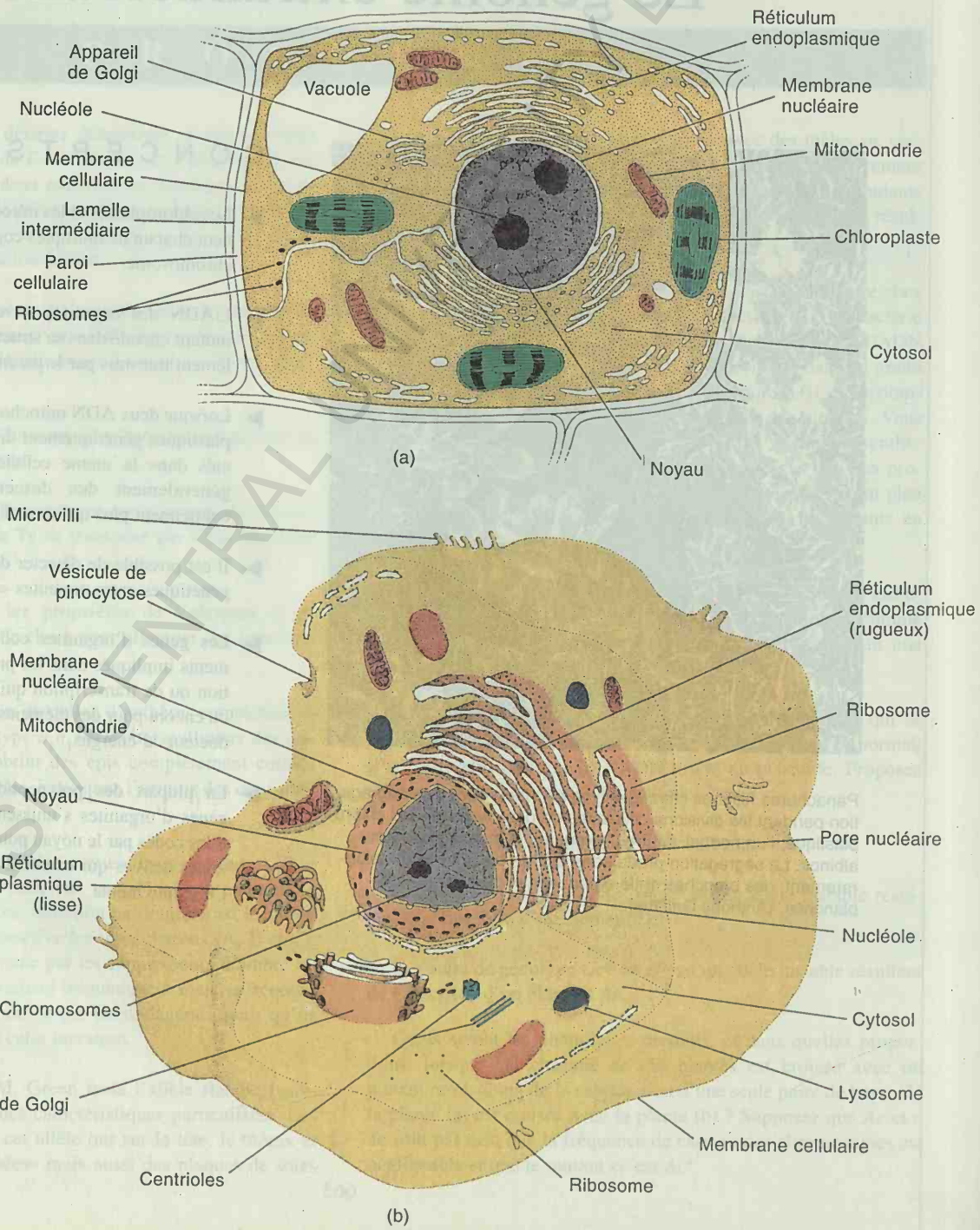


Figure 22-1.
L'hétérogénéité du cytoplasme. La zone appelée cytoplasme (tout ce qui se trouve entre l'enveloppe nucléaire et la membrane de la cellule) comprend le cytosol (phase liquide) et un riche assortiment d'organites, de membranes et d'autres structures. Les gènes extranucléaires se trouvent dans les mitochondries ainsi que dans les chloroplastes des plantes vertes. (a) Une cellule végétale. (b) Une cellule animale. (La partie b vient de S. Singer et H.R. Hilgard, *The Biology of People*. Copyright © 1978 par W.H. Freeman et Company ; la partie a de J. Janick et al., *Plant Science*. Copyright © 1974 par W.H. Freeman et Company.)

BCU IAS / CENTRAL LIBRARY

pés sur un chromosome d'organite. On appelle souvent les gènes extranucléaires extrachromosomiques - un terme susceptible de créer des confusions puisque les gènes qui équipent les mitochondries et les chloroplastes constituent en fait des chromosomes extranucléaires. Néanmoins il faut souligner que les chromosomes des organites présentent des agencements et des modes de transmission assez différents de ceux des chromosomes nucléaires. Vu leur localisation cytoplasmique, les gènes extranucléaires sont aussi qualifiés de cytoplasmiques.

Nos connaissances concernant la génétique et la biochimie des gènes d'organites sont déjà étendues. Ce chapitre retrace certaines des étapes principales qui en ont marqué le développement. Il fournit un bel exemple de la puissance que peut déployer l'analyse génétique lorsqu'elle se combine avec la biologie moléculaire.

Message Les gènes diversement appelés cytoplasmiques, extrachromosomiques ou extranucléaires se trouvent sur un type de chromosome particulier à l'intérieur des organites cellulaires.

Panachure sur des feuilles de plantes supérieures

En 1909, Carl Correns publia des observations surprenantes sur la belle-de-nuit (*Mirabilis jalapa*). Sur ces plantes panachées se forment de nombreuses feuilles tachetées, présentant des zones vertes et des zones blanches ; cependant certaines branches ne portent que des feuilles vertes ou des feuilles blanches (figure 22-2).

Des fleurs se forment sur tous les types de branches. Correns croisa entre elles des fleurs de diverses origines en transférant le pollen de l'une à l'autre. Le tableau 22-1 résume les résultats de ces expériences. Ils présentent deux particularités surprenantes. En premier lieu les résultats des croisements réciproques sont différents : par exemple, ♀ blanche × ♂ vert donne un autre résultat que ♀ verte × ♂ blanc. Rappelez-vous que Mendel n'observait jamais de différences entre les résultats des croisements réciproques. En fait, en génétique conventionnelle on ne s'attend à des différences entre croisements réciproques qu'en cas de gènes liés au sexe. Les résultats des croisements de belle-de-nuit ne peuvent cependant s'expliquer de cette manière.

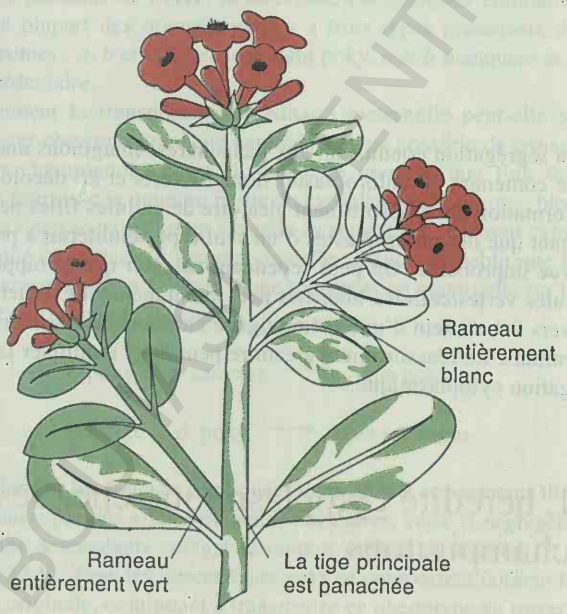


Figure 22-2. Panachure des feuilles chez *Mirabilis jalapa*, la belle-de-nuit. Les fleurs peuvent se former sur n'importe quelle branche (panachée, verte ou blanche), et ces fleurs peuvent être utilisées dans des croisements.

Tableau 22-1. Résultats de croisements entres belles-de-nuit panachées.

Phénotype de la branche fournissant l'ovule (♀)	Phénotype de la branche fournissant le pollen (♂)	Phénotype de la descendance
Blanc	Blanc	Blanc
Blanc	Vert	Blanc
Blanc	Panaché	Blanc
Vert	Blanc	Vert
Vert	Vert	Vert
Vert	Panaché	Vert
Panaché	Vert	Panaché, vert ou blanc
Panaché	Vert	Panaché, vert ou blanc
Panaché	Panaché	Panaché; vert ou blanc

Deuxième particularité surprenante : c'est le phénotype du parent maternel qui, seul, détermine le phénotype de toute la descendance. Le phénotype du parent mâle ne semble jouer aucun rôle ; en d'autres termes sa contribution à la descendance paraît nulle ! Ce phénomène porte le nom d'**hérédité maternelle.** Bien que les descendants blancs ne survivent pas longtemps vu qu'ils manquent de chlorophylle, les autres types survivent et se prêtent à des croisements ultérieurs. Au cours de ceux-ci, l'hérédité maternelle continue à se manifester de la même manière que dans les croisements originaux.

Comment des résultats aussi curieux peuvent-ils s'expliquer ? Les différences de coloration des feuilles sont dues, on le sait, à la présence de chloroplastes verts ou décolorés. Dès lors, les modes de transmission observés pourraient se comprendre si ces organites cytoplasmiques étaient doués d'autonomie génétique et s'ils n'étaient, en outre, jamais transmis par le parent pollinisateur. Pour qu'un organite jouisse d'une autonomie génétique il doit posséder ses propres déterminants génétiques, responsables de son phénotype. Dans le cas présent ce seraient donc les chloroplastes qui auraient en propre des gènes intervenant dans leur coloration. Avec ce raisonnement naît donc la notion que cet organite possède son propre génome. L'idée qu'il ne soit pas transmis par le pollen est raisonnable puisque, dans le zygote, la majeure partie du cytoplasme provient du parent maternel via le cytoplasme de l'ovule. La figure 22-3 présente un modèle qui rend compte des modes de transmissions décrits dans le tableau 22-1.

BOSTON UNIVERSITY CENTRAL LIBRARY

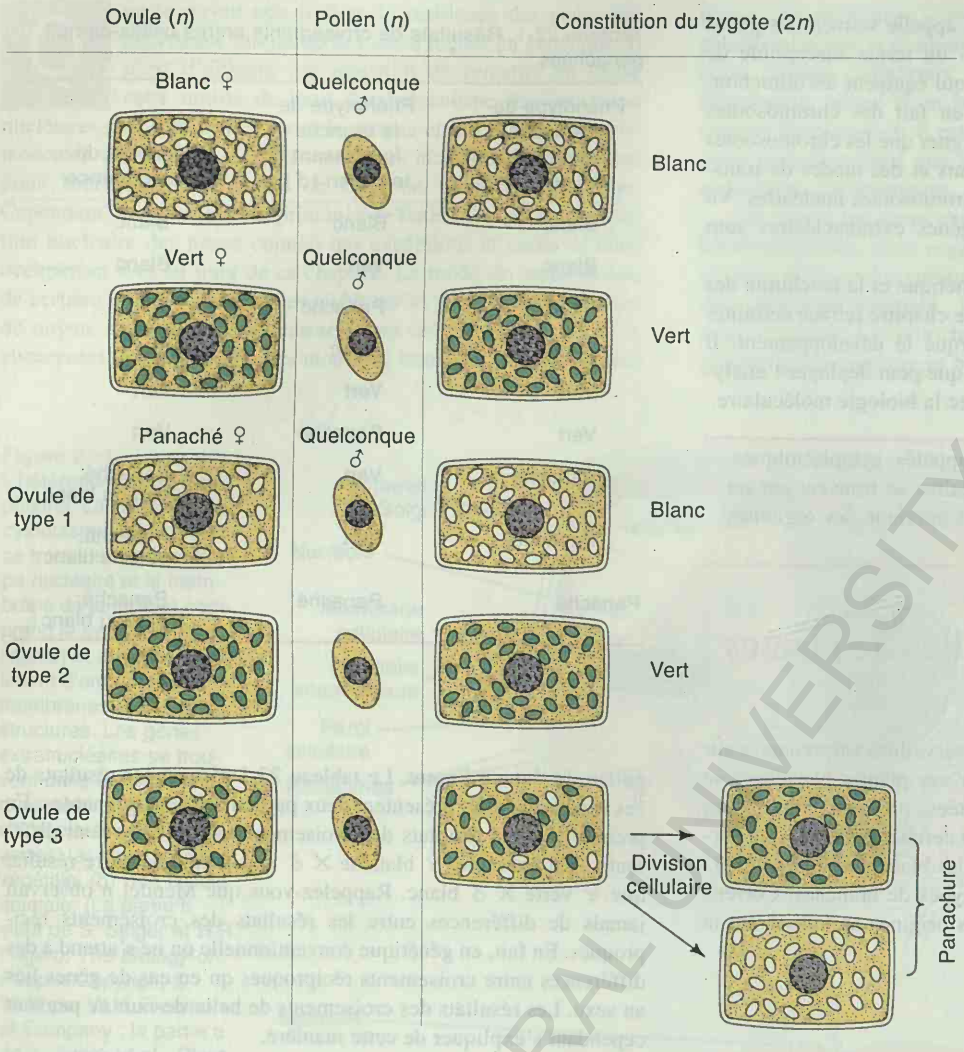


Figure 22-3. Un modèle expliquant les résultats des croisements de *Mirabilis jalapa* par la transmission de chloroplastes autonomes. Les sphères sombres et de grande taille sont les noyaux. Les corps de taille plus réduite sont les chloroplastes, soit verts, soit décolorés. Chaque ovule contiendrait plusieurs chloroplastes mais il n'y en aurait aucun dans une cellule de pollen. Les deux premiers croisements suivent une transmission maternelle stricte. Si la branche maternelle est panachée, trois types de zygotes en résultent, suivant que l'ovule ne contienne que des chloroplastes verts, décolorés ou un mélange des deux. Dans ce dernier cas, le zygote peut produire et du tissu vert et du tissu blanc, ce qui fait que la plante est panachée.

Les branches panachées semblent produire trois sortes d'ovules : certains ne contiennent que des chloroplastes décolorés, d'autres uniquement des verts et le reste un mélange des deux. Ce dernier type d'ovule produira un zygote également pourvu des deux sortes de chloroplastes. Au cours des mitoses ultérieures, une forme de ségrégation cytoplasmique semble se produire ; elle va donner naissance à des lignées cellulaires pures ne contenant qu'un type de chloroplastes, ce qui produira chez le plant issu de ce zygote un phénotype panaché.

Ce processus de tri pourrait s'appeler «ségrégation mitotique». Cependant, comme il s'agit d'un phénomène *extranucléaire*, à ne pas confondre avec la ségrégation mitotique des gènes nucléaires, une appellation plus spécifique est de rigueur. Nous utiliserons l'expression **ségrégation cytoplasmique**. Nous y reviendrons souvent ; elle semble être un trait commun aux génomes extranucléaires. Soulignons que ces processus de ségrégation cytoplasmique se produisent à peu près en même temps que la division nucléaire mitotique. Les deux systèmes sont représentés en parallèle sur la figure 22-4.

Nous pourrions nous demander si un réassortiment aléatoire des chloroplastes entre verts et blancs ne pourrait pas expliquer la ségrégation conduisant aux panachures. Imaginons une cellule contenant 40 chloroplastes dont 20 verts et 20 décolorés ; la formation par réassortiment aléatoire de cellules filles ne contenant que des chloroplastes d'un seul type semblerait à première vue improbable. On peut cependant calculer que le rapport cellules vertes/cellules blanches peut spontanément évoluer de 1:0 vers 0:1 au sein d'une même lignée au cours de plusieurs générations. Le réassortiment aléatoire peut donc expliquer la ségrégation cytoplasmique.

L'hérédité cytoplasmique chez les champignons

Le mutant Poky de *Neurospora*

En 1952, Mary Mitchell isola un mutant de *Neurospora* auquel elle donna le nom de «*poky*» (misérable). Son phénotype se distingue de celui du sauvage par une croissance lente, un mode de

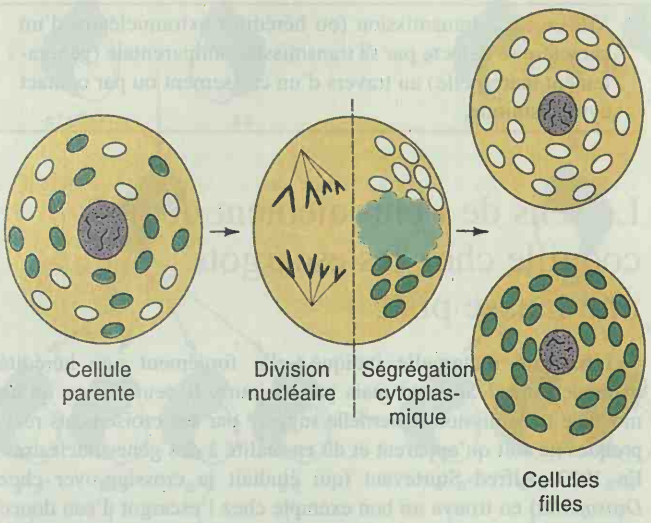


Figure 22-4. Deux processus s'observent lors de la division cellulaire. La division nucléaire (mitose) est un processus physique bien décrit, qui partitionne les chromosomes. En parallèle, un mélange hétérogène d'organites possédant des génomes différents peut parfois subir une ségrégation donnant des cellules filles à cytoplasme homogène. Les schémas représentent une ségrégation cytoplasmique produisant deux jeux d'organelles différents à partir d'une cellule parentale mixte. Le mécanisme de cette ségrégation cytoplasmique n'est pas encore bien compris.

transmission maternelle et une teneur anormale en cytochromes. Les cytochromes sont des protéines mitochondriales transportant les électrons ; leur action est nécessaire pour que l'oxydation des aliments produise de l'ATP, la «monnaie énergétique» cellulaire. Chez la plupart des organismes il y a trois types principaux de cytochromes : *a*, *b* et *c*. Chez le mutant poky, *a* et *b* manquent et *c* est excédentaire.

Comment la transmission héréditaire maternelle peut-elle se manifester chez un organisme haploïde ? Il est possible de croiser certains champignons entre eux de telle manière que l'un des parents fournisse la majeure partie du cytoplasme du zygote ; bien qu'il ne s'agisse pas d'union sexuelle au sens strict, le parent cytoplasmique est considéré comme «femelle». Mitchell établit que le phénotype poky faisait l'objet d'une transmission maternelle sur la base des croisements suivants :

♀ poky × ♂ sauvage ⟶ tous poky

♀ sauvage × ♂ poky ⟶ tous sauvages

Cependant, si les souches impliquées dans de tels croisements diffèrent aussi par des allèles de gènes nucléaires, ceux-ci ségrègent parmi les descendants suivant le rapport mendélien normal 1 : 1 (figure 22-5). Tous les descendants *poky* se comportent comme la souche originale, continuant à transmettre ce phénotype au travers de nombreuses générations lorsqu'on les utilise comme souches femelles. Comme *poky* se comporte différemment d'une mutation nucléaire il fut désigné comme **mutation extranucléaire** ou encore **cytoplasmique**.

Quel est le siège de cette mutation ? Plusieurs indices suggèrent que le phénotype poky affecte les mitochondries. Par exemple, la croissance cellulaire ralentie pourrait être due à une déficience en ATP, produit du métabolisme mitochondrial. De plus les mutants *poky* contiennent des quantités anormales de cytochromes ; or ces derniers se trouvent dans la membrane mitochondriale. Ces indices ont conduit les généticiens à impliquer les mitochondries dans le génotype *poky* et à concevoir diverses expériences pour mettre à l'épreuve la notion d'autonomie mitochondriale.

David Luck marqua les mitochondries avec de la choline radioactive (cette substance est un constituant normal de la membrane) et suivit leur division dans un milieu non marqué en se servant d'autoradiographies prises au cours du temps. Il observa que même après plusieurs doublements de la masse cellulaire, la radioactivité restait partagée de manière égale entre les mitochondries. Luck en conclut que celles-ci pouvaient croître et se diviser d'une manière autonome plutôt que sous le contrôle du noyau. Si les mitochondries étaient normalement synthétisées de novo on s'attendrait à en observer de non marquées tandis que la population d'origine resterait fortement marquée.

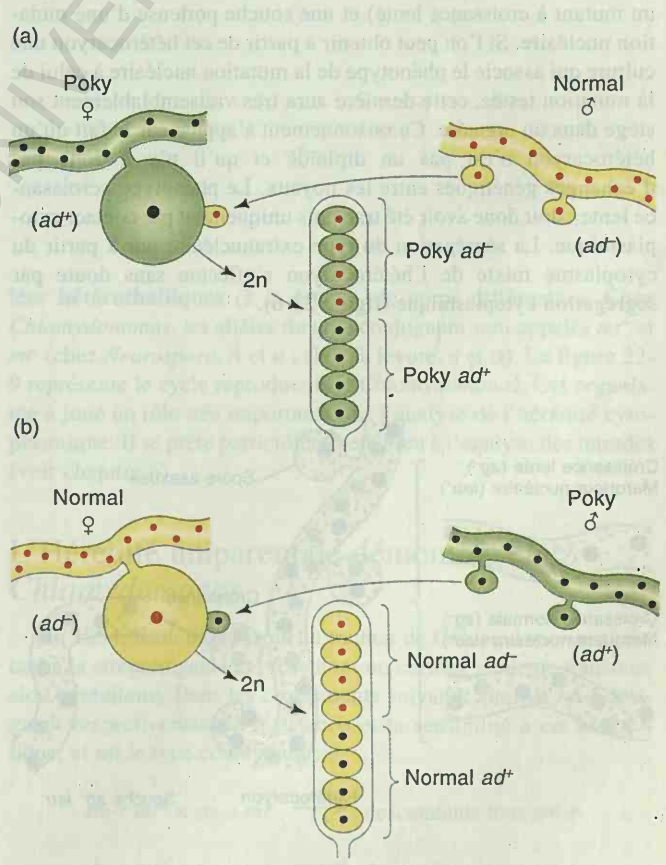


Figure 22-5. Explication des différents résultats obtenus lors de croisements réciproques entre souches de *Neurospora* poky et normales. La plus grande partie du cytoplasme des cellules issues de ces croisements provient du parent considéré comme femelle. Les zones colorées représentent le cytoplasme contenant les déterminants poky. Le locus nucléaire ad^+/ad^- est représenté pour illustrer la ségrégation des gènes nucléaires suivant le rapport mendélien prévu 1 : 1.

En 1965, le groupe d'Edward Tatum réussit à purifier les mitochondries d'un mutant dit «*anormal*», très semblable à *poky*. Grâce à une aiguille ultra-fine et une seringue ces chercheurs injectèrent les mitochondries dans des cellules sauvages tout en effectuant les contrôles appropriés. Les cellules ainsi traitées furent mises en culture. Voici qu'après plusieurs transferts le phénotype mutant apparut ! En injectant les mitochondries les chercheurs avaient donc transféré les déterminants héréditaires du phénotype *anormal*. Il devenait dès lors probable que le gène extranucléaire responsable de ce phénotype résidait dans la mitochondrie. Ces déductions se trouvèrent renforcées par la découverte de l'ADN mitochondrial de *Neurospora* et d'autres espèces (nous reviendrons plus loin sur ce point).

Le test de l'hétérocaryon

La transmission (ou hérédité) maternelle d'un caractère est l'un des critères qui permet d'impliquer un organite comme le siège de son déterminant héréditaire. Un autre test peut être appliqué chez des champignons filamenteux tels que *Neurospora* et *Aspergillus* et pourrait l'être, en principe à tous les organismes susceptibles de former des hétérocaryons. Formons un hétérocaryon entre un mutant que nous soupçonnons d'être extranucléaire (par exemple, un mutant à croissance lente) et une souche porteuse d'une mutation nucléaire. Si l'on peut obtenir à partir de cet hétérocaryon une culture qui associe le phénotype de la mutation nucléaire à celui de la mutation testée, cette dernière aura très vraisemblablement son siège dans un organite. Ce raisonnement s'appuie sur le fait qu'un hétérocaryon n'est pas un diploïde et qu'il n'y a donc pas d'échanges génétiques entre les noyaux. Le phénotype «croissance lente» doit donc avoir été transmis uniquement par contact cytoplasmique. La ségrégation du type extranucléaire pur à partir du cytoplasme mixte de l'hétérocaryon s'effectue sans doute par ségrégation cytoplasmique (figure 22-6).

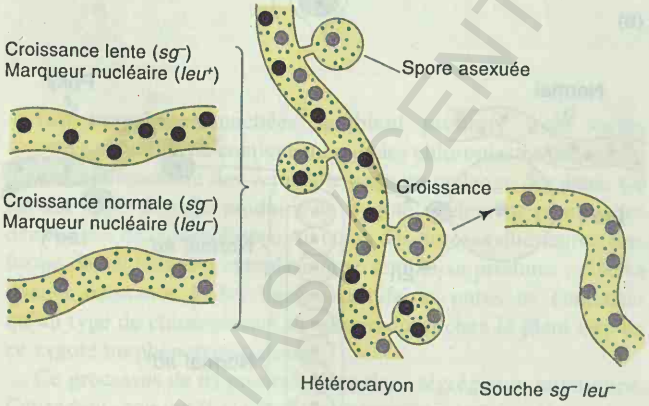


Figure 22-6. Le test de l'hétérocaryon est utilisé pour détecter l'hérédité extranucléaire chez les champignons filamenteux (mycéliens). Une mutation extranucléaire éventuelle (ici *sg*, cause de croissance lente) est combinée avec une mutation nucléaire (*leu*) pour former un hétérocaryon. A partir de l'hétérocaryon on peut obtenir des cultures *leu*⁻. Si certaines de ces cultures ont aussi le phénotype *sg* il est alors très probable que *sg* soit un gène extranucléaire porté par un organite. Puisqu'il ne se produit pas de recombinaison nucléaire chez un hétérocaryon, le phénotype *sg* doit avoir été acquis par contact cytoplasmique.

Message La transmission (ou hérédité) extranucléaire d'un caractère se détecte par sa transmission uniparentale (généralement maternelle) au travers d'un croisement ou par contact cytoplasmique.

Le sens de l'enroulement de la coquille chez les escargots : une fausse piste

L'hérédité maternelle indique-t-elle forcément une hérédité extranucléaire ? Souvent mais pas toujours. Il peut arriver qu'un mode de transmission maternelle suggéré par des croisements réciproques ne soit qu'apparent et dû en réalité à des gènes nucléaires. En 1923, Alfred Sturtevant (qui étudiait le crossing-over chez *Drosophila*) en trouva un bon exemple chez l'escargot d'eau douce *Limnaea*. Sturtevant analysait des croisements entre escargots qui différaient par le sens d'enroulement de la coquille. Faisant face à l'ouverture des coquilles, on remarquera que certaines sont enroulées vers la droite (enroulement dextre) et d'autres vers la gauche (enroulement sénestre). Toute la F_1 d'un croisement ♀ dextre × ♂ sénestre est dextre mais toute la F_1 d'un croisement ♀ sénestre × ♂ dextre est sénestre. Jusqu'ici la situation est très semblable à celle du mutant poky ou aux cas d'hérédité chloroplastique. Cependant la F_2 est entièrement dextre dans les deux cas !

Dans ce cas-ci, c'est la F_3 qui révéla que la transmission du caractère sens de l'enroulement met en jeu des gènes nucléaires plutôt qu'extranucléaires. (La F_3 est produite par autofécondation des individus de la F_2, ce qui est possible puisque les escargots sont hermaphrodites). Sturtevant trouva que les trois quarts des escargots F_3 étaient dextres et un quart sénestre (figure 22-7), un rapport qui révélait une ségrégation mendélienne dans la génération F_2. Sturtevant en conclut non seulement que dextre (+) était dominant par rapport à sénestre (*s*), mais aussi — résultat plus inattendu — que le phénotype d'enroulement de tout individu était déterminé par le génotype (non le phénotype) de sa mère ! Nous savons à présent que ceci se produit parce que c'est le génotype de la mère qui détermine le mode de clivage de l'embryon. Notez que les rapports de ségrégation de la figure 22-8 ne pourraient s'obtenir entre phénotypes de véritables gènes d'organites. Cet exemple montre bien que l'examen d'une seule génération ne suffit pas pour établir si une hérédité de type maternel est due à des gènes d'organite. On utilisera l'expression **effet maternel** pour des cas semblables à celui de l'enroulement de la coquille, afin de les distinguer des cas authentiques de transmission de gènes d'organites.

Les gènes extranucléaires de *Chlamydomonas*

Si l'on demandait à un chercheur de concevoir un organisme au cycle reproductif simple et qui se prête bien à l'analyse expérimentale, cet être idéal aurait toute chance de ressembler à l'algue d'eau douce unicellulaire *Chlamydomonas* (figure 22-8). Comme les champignons, les algues n'ont que rarement des sexes différents mais elles possèdent des types conjuguants. Un croisement ne peut se produire qu'entre parents de types conjuguants différents. Ceux-ci sont physiquement indiscernables mais présentent des différences physiologiques. Les espèces de ce type sont appe-

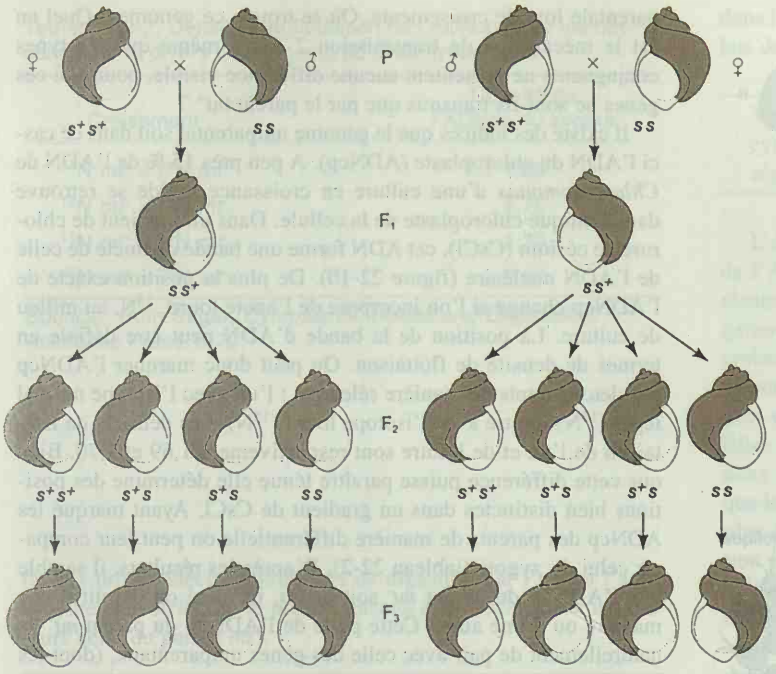


Figure 22-7. La transmission des gènes nucléaires déterminant l'enroulement dextre (+) ou sénestre (*s*) de la coquille d'un escargot d'eau douce. Le sens de l'enroulement est déterminé par le génotype nucléaire de la mère, non par celui de l'individu considéré. Cette explication rend compte de la différence observée entre les résultats des premiers croisements (réciproques) ainsi que des phénotypes observés au cours des générations ultérieures. Aucune transmission par organite n'est ici mise en cause (une telle hypothèse n'expliquerait pas les génotypes des générations ultérieures).

Figure 22-8. Cellules vivantes de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Noter la paire de flagelles et le grand chloroplaste unique. (M.I. Walker/Science Source/Photo Researchers).

lées **hétérothalliques** (à la lettre, «de corps différents»). Chez *Chlamydomonas*, les allèles du type conjuguant sont appelés mt^+ et mt^- (chez *Neurospora*, *A* et *a* ; chez la levure, *a* et α). La figure 22-9 représente le cycle reproductif de *Chlamydomonas*. Cet organisme a joué un rôle très important dans l'analyse de l'hérédité cytoplasmique. Il se prête particulièrement bien à l'analyse des tétrades (voir chapitre 6).

L'Hérédité uniparentale démontrée chez *Chlamydomonas*

En 1954, Ruth Sager isola un mutant de *Chlamydomonas* résistant à la streptomycine et présentant un curieux mode de transmission héréditaire. Dans les croisements suivants, *sm-r* et *sm-s* désignent respectivement la résistance et la sensibilité à cet antibiotique, et mt le type conjuguant :

$$sm\text{-}r\ mt^+ \times sm\text{-}s\ mt^- \longrightarrow \text{descendants tous } sm\text{-}r$$

$$sm\text{-}s\ mt^+ \times sm\text{-}r\ mt^- \longrightarrow \text{descendants tous } sm\text{-}s$$

Conclusion : vis-à-vis de la streptomycine toute la progéniture exhibe le phénotype du parent mt^+. On peut qualifier ce phénomène d'hérédité uniparentale, comparable aux cas d'hérédité maternelle. De fait, cette analogie a poussé Sager à qualifier le type mt^+ de «femelle». Cependant il n'existe aucune différence dans l'aspect physique des types conjuguants (comme ce serait le cas s'ils représentaient des sexes opposés) ni dans leurs contributions cyto-

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

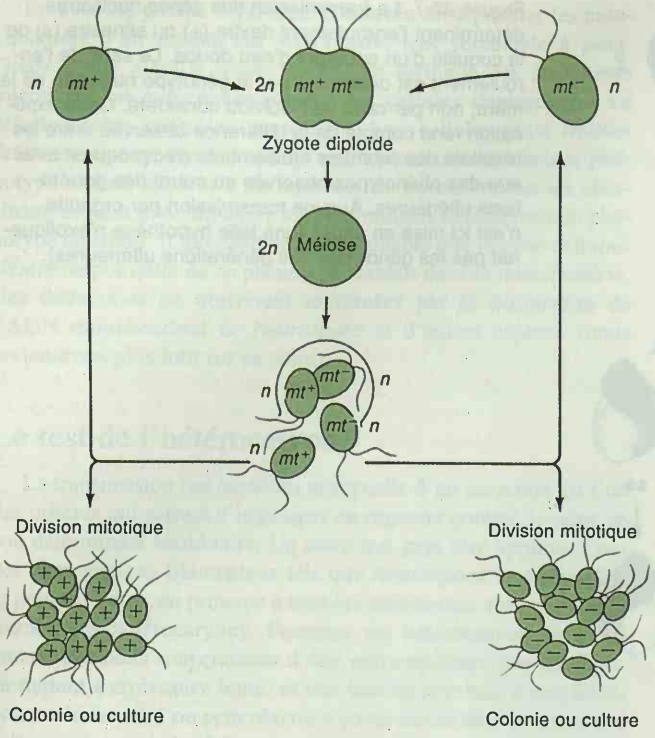


Figure 22-9. Représentation schématique du cycle de reproduction de *Chlamydomonas*, une algue verte unicellulaire. Cet organisme a joué un rôle central dans les recherches sur la génétique des organites. Pour que le cycle sexuel se produise, les types conjuguants mt^+ et mt^-, déterminés par des allèles nucléaires, doivent être mis en présence.

plasmiques respectives (comme chez *Neurospora*). Dans ces croisements, les marqueurs nucléaires conventionnels (comme *mt* lui-même) se comportent normalement et ségrègent parmi la descendance suivant le rapport 1 : 1. Par exemple, une moitié de la descendance du croisement *sm-r* $mt^+ \times$ *sm-s* mt^- est *sm-r* mt^+ et l'autre *sm-r* mt^-.

Pour déterminer le phénotype en présence de streptomycine, on étale les cellules sur un milieu contenant cet antibiotique. En effectuant de telles expériences, Sager constata que la streptomycine elle-même se comportait comme un agent mutagène. Lorsqu'on étale une culture pure de cellules *sm-s* sur un milieu contenant de la streptomycine, un nombre important de colonies résistantes se développent. De fait un traitement par la streptomycine produit une moisson de divers phénotypes mutants : tous présentent un mode de transmission uniparental et semblent donc extranucléaires. En outre, un tel traitement ne produit pas de mutants nucléaires. La plupart de ceux qui sont induits par la streptomycine sont résistants à un ou plusieurs produits pharmaceutiques ou sont déficients sur le plan de la photosynthèse. Les mutants photosynthétiques ne sont plus capables d'utiliser le CO_2 de l'air comme source de carbone et survivent uniquement si une substance carbonée soluble (telle que l'acétate) est présente dans le milieu.

Ces expériences mettent en lumière l'existence d'un mystérieux «génome uniparental» chez *Chlamydomonas* — en d'autres termes un groupe de gènes qui tous révèlent un mode de transmission uniparentale lors de croisements. Où se trouve ce génome ? Quel en est le mécanisme de transmission ? Alors même que les types conjuguants ne présentent aucune différence visible, pourquoi ces gènes ne sont-ils transmis que par le parent mt^+ ?

Il existe des indices que le génome uniparental soit dans ce cas-ci l'ADN du chloroplaste (ADNcp). A peu près 15 % de l'ADN de *Chlamydomonas* d'une culture en croissance rapide se retrouve dans l'unique chloroplaste de la cellule. Dans un gradient de chlorure de césium (CsCl), cet ADN forme une bande distincte de celle de l'ADN nucléaire (figure 22-10). De plus la position exacte de l'ADNcp change si l'on incorpore de l'azote lourd, ^{15}N, au milieu de culture. La position de la bande d'ADN peut être définie en termes de densité de flottaison. On peut donc marquer l'ADNcp des deux parents de manière sélective : l'un avec l'isotope normal léger (^{14}N) l'autre avec l'isotope lourd (^{15}N). Les densités de flottaison de l'un et de l'autre sont respectivement 1,69 et 1,70. Bien que cette différence puisse paraître ténue elle détermine des positions bien distinctes dans un gradient de CsCl. Ayant marqué les ADNcp des parents de manière différentielle on peut leur comparer celui du zygote (tableau 22-2). D'après les résultats, il semble que l'ADNcp du parent mt^- soit perdu, inactivé ou détruit d'une manière ou d'une autre. Cette perte de l'ADNcp du parent mt^- va naturellement de pair avec celle des gènes uniparentaux, (dont les gènes *sm*), portés par le parent mt^-.

La même logique a présidé à d'autres séries d'expériences. Par exemple, si l'on procède à des croisements entre souches de *Chlamydomonas* pourvues d'ADNcp reconnaissables par leurs dif-

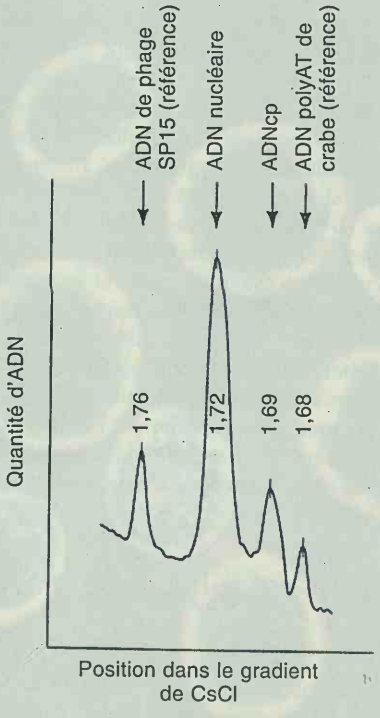


Figure 22-10. L'ADN du chloroplaste (ADNcp) de *Chlamydomonas* peut être détecté dans un gradient de densité de CsCl comme une bande distincte de l'ADN nucléaire. Dans cette expérience-ci, deux autres types d'ADN ont été mis à sédimenter avec l'ADN de *Chlamydomonas* pour servir de points de référence dans le gradient. Les nombres indiquent les densités de flottaison (g/cm^3) des différents types d'ADN. D'après Ruth Sager, (*Cytoplasmic Genes and Organelles*, Academic Press,1972)

Tableau 22-2. Densités de flottaison de l'ADNcp chez les descendants de divers croisements de *Chlamydomonas*

Croisement	Densité de l'ADNcp du zygote
^{14}N $mt^+ \times {}^{14}N$ mt^-	1,69
^{15}N $mt^+ \times {}^{15}N$ mt^-	1,70
^{15}N $mt^+ \times {}^{14}N$ mt^-	1,70
^{15}N $mt^+ \times {}^{15}N$ mt^-	1,69

SOURCE : Ruth Sager, *Cytoplasmic Genes and Organelles*, Academic Press,1972.

férents profils électrophorétiques de digestion par l'un ou l'autre enzyme de restriction, le profil transmis à la descendance est toujours celui du parent mt^+.

Message L'ADNcp de *Chlamydomonas* est transmis de manière uniparentale. Comme le comportement de cet ADN suit fidèlement celui des gènes transmis uniparentalement, nous pouvons en conclure que ces derniers sont bien portés par l'ADNcp.

La cartographie des gènes de chloroplastes chez *Chlamydomonas*

Nous avons vu que *Chlamydomonas* possède un grand nombre de gènes transmis uniparentalement. Ces gènes sont-ils liés ? Sont-ils disposés sur un seul groupe de liaison (un chromosome) ou sur plusieurs ? Ou bien chaque gène est-il réassorti indépendamment comme s'il occupait sa propre molécule d'ADN ? Pour aborder ce problème dans la tradition de l'analyse génétique classique il suffirait en principe de procéder à un test de recombinaison. Dans ce cas-ci, cependant, cette approche bute sur un obstacle important. Les deux ADN parentaux doivent être présents si l'on veut qu'ils se recombinent ; or nous avons vu que l'ADNcp du parent mt^- est éliminé dans le zygote. Heureusement il existe une issue à ce dilemme.

Dans les croisements mt^+ *sm-r* × mt^- *sm-s*, on trouve qu'environ 0,1 pour cent des zygotes contiennent les deux types de gènes, *sm-r* et *sm-s*. Cette double présence se déduit du fait que parmi les produits méiotiques de telles cellules on retrouve l'un et l'autre phénotype sm. Pour des raisons évidentes, on appelle de tels zygotes, **zygotes biparentaux** et leur condition génétique est qualifiée d'«hétérozygote cytoplasmique» (**cytohet** ou **hétéroplasmon**). Il semblerait que dans ces quelques rares zygotes, l'inactivation du parent mt^- ne se produise pas. Quoi qu'il en soit, les cytohets nous fournissent précisément le matériel dont nous avons besoin pour étudier la recombinaison : en effet, ces cellules contiennent les *deux* types d'ADNcp parental. A première vue, la rareté des zygotes biparentaux entrave leur étude systématique mais, heureusement, on peut accroître leur fréquence en exposant le parent mt^+ aux rayons ultra-violets avant le croisement. Après un tel traitement, 40 à 100 pour cent des zygotes deviennent des cytohets. (Notez que ceci implique un rôle actif de la cellule mt^+ dans l'élimination de l'ADNcp du parent mt^-. Les rayons ultra-violets doivent inactiver cette fonction.)

Message Chez *Chlamydomonas*, les zygotes biparentaux (ou cytohets) sont le point de départ de toute recherche sur la ségrégation et la recombinaison des gènes chloroplastiques.

L'étude des cytohets a permis d'établir une carte satisfaisante de l'ADNcp. Pour déceler la liaison génétique de gènes extranucléaires l'une des meilleures méthodes est d'étudier leur coségrégation au cours du même croisement. Voyons par exemple, un croisement du type mt^+ *sm-s* ac^+ × mt^- *sm-r* ac^-(*ac* signifie exigence pour l'acétate). On obtient d'abord des zygotes biparentaux. On peut déceler la ségrégation cytoplasmique dans les deux cellules filles produites lors des premières mitoses qui s'ensuivent. Si les deux gènes sont étroitement liés on considérera comme normal que leur ségrégation cytoplasmique s'effectue de pair. A des gènes plus distants devraient correspondre des fréquences de coségrégation proportionnellement moins élevées.

Sager codifia ces procédures en se servant de souches de référence. Elle montra qu'on pouvait ainsi obtenir une carte cohérente et additive des gènes «uniparentaux» mais à une condition cependant : qu'on la referme sur elle-même comme si l'ADNcp était lui-même circulaire. La carte établie par cette technique et confirmée par d'autres est donnée dans la figure 22-11. A présent l'existence d'ADNcp circulaires est bien démontrée chez plusieurs espèces de plantes. Cette évolution rappelle l'histoire de la génétique classique : les cartes génétiques des chromosomes nucléaires furent elles aussi dressées bien avant que l'on puisse établir l'existence de leurs supports physiques. On en sait maintenant bien davantage sur l'ADNcp de plusieurs organismes ; nous y reviendrons après avoir discuté le génome extranucléaire de la levure.

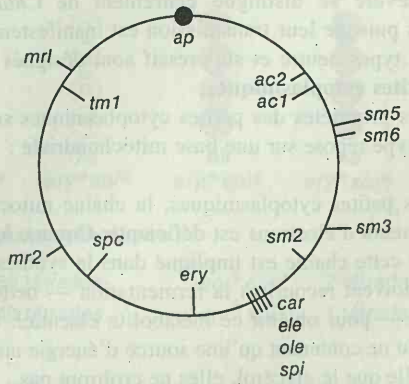


Figure 22-11. Carte circulaire de l'ADNcp de *Chlamydomonas* dérivée de l'analyse génétique. La carte doit être circulaire pour se conformer à l'ensemble des données topographiques fournies par les croisements. (D'après Ruth Sager, «Genetic Analysis of Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*», in *Cytoplasmic Genes and Organelles*, Academic Press,1972).

Les gènes mitochondriaux de la levure

Le développement le plus fructueux qu'ait connu l'histoire des recherches sur l'hérédité extranucléaire est sans doute l'émergence de nos idées actuelles sur le génome mitochondrial de la levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*). Cet accomplissement témoigne de la puissance que peut déployer l'analyse génétique lorsqu'elle se combine aux techniques moléculaires modernes. Voyons d'abord la contribution de l'analyse génétique proprement dite.

Trois sortes de mutants se sont avérés particulièrement importants : les «petites», *ant*^{R} et *mit*$^-$. Au cours des années 1940, Boris Ephrussi et ses collègues décrivirent pour la première fois de curieux mutants de levure. Les cellules du type sauvage développent des colonies assez importantes sur milieu gélosé. Parmi ces colonies se rencontre, ici et là, une «petite» (le terme tel quel est devenu une appellation internationale pour désigner les mutants de ce type). Ces dernières se répartissent en trois catégories d'après leur mode de transmission héréditaire. La première comprend les **petites ségrégationnelles,** ainsi nommées parce que chaque tétrade issue d'un croisement avec une souche de taille normale (ou «grande») contient deux ascospores qui donnent des colonies normales et deux autres qui donnent des petites. De toute évidence, cette ségrégation mendélienne 1 : 1 indique que ce type de petite est dû à une mutation nucléaire. La seconde catégorie est celles des **petites neutres** : un croisement avec une grande ne fournit que des ascospores produisant des colonies normales — un cas bien clair de transmission uniparentale. La troisième catégorie comprend les **petites suppressives** qui, après le même type de croisement donnent un mélange d'ascospores normales et d'ascospores se développant en petites. Leur proportion relative est variable d'une souche à l'autre mais reste spécifique d'une souche donnée ; certaines petites suppressives ne donnent même que des petites comme produits de tels croisements. Les petites suppressives montrent donc un mode de transmission non mendélien et certaines même un mode uniparental.

Dans un croisement de levures, les deux cellules parentales fusionnent et apportent une contribution apparemment équivalente au cytoplasme de la cellule diploïde ainsi formée. (figure 22-12). En outre la transmission des caractères petite suppressive et neutre est indépendante de celle du type conjuguant. Sur ce point donc, la levure se distingue clairement de *Chlamydomonas*. Néanmoins puisque leur transmission est manifestement extranucléaire, les types neutre et suppressif sont désignés globalement comme **petites cytoplasmiques.**

Plusieurs propriétés des petites cytoplasmiques suggèrent que leur phénotype repose sur une base mitochondriale :

1. Chez les petites cytoplasmiques, la chaîne mitochondriale de transporteurs d'électrons est déficiente. Comme le fonctionnement de cette chaîne est impliqué dans la synthèse d'ATP, les petites doivent recourir à la fermentation — nettement moins efficace — pour obtenir ce métabolite essentiel. Placées dans un milieu ne contenant qu'une source d'énergie non fermentescible, telle que le glycérol, elles ne croîtront pas.

2. Ces petites ne présentent plus de synthèse protéique mitochondriale. Les mitochondries normales possèdent leur propre dispositif de synthèse protéique, composé d'un jeu particulier d'ARNt et de ribosomes, tous deux fort différents de leurs homologues présents dans le **cytosol,** c'est-à-dire la composante extra-organitaire du cytoplasme.

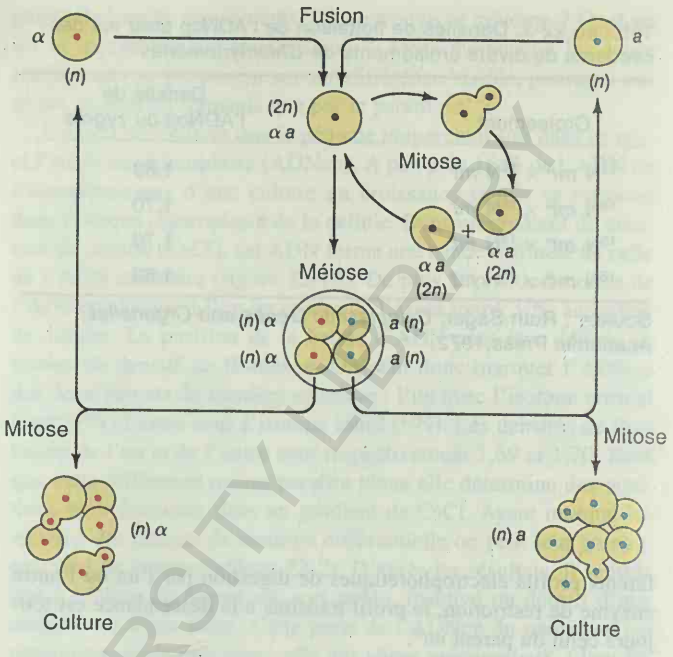


Figure 22-12. Le cycle reproductif de la levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*). Les allèles *a* et *α* déterminent le type conjuguant et sont nucléaires. La fusion entre une cellule *a* et une cellule *α* produit une cellule diploïde. Normalement celle-ci entame un cycle mitotique (par bourgeonnement). Cependant on peut provoquer la méiose (ou sporulation) en plaçant cette cellule sur un milieu spécial. Notez que le bourgeonnement comporte l'apparition d'une petite excroissance sur le côté de la cellule parente ; ce bourgeon grandit et finalement se sépare pour devenir l'une des cellules filles.

3. Chez tous les organismes examinés, les mitochondries sont pourvues de leur propre ADN ; la quantité en est relativement faible par rapport à l'ADN nucléaire mais il s'agit d'un ADN différent. L'**ADN mitochondrial (ADNmt)** des petites diffère radicalement de celui des souches sauvages. Les petites neutres sont totalement dépourvues d'ADNmt, tandis que les petites suppressives sont caractérisées par des modifications dans le rapport des bases.

La deuxième classe importante de mutants de levure, les mutants *ant*^{R}, ont été reconnus à l'origine par leur phénotype de résistance à certains antibiotiques. Par exemple, certains sont résistants au chloramphénol (cap^R), à l'érythromycine (ery^R), la spiromycine (spi^R), la paramomycine (par^R) ou à l'oligomycine (oli^R). Chacune de ces mutations présente un mode de transmission non mendélien semblable à celui des petites suppressives ; en l'occurrence, d'un croisement tel que *ery*^{R} × *ery*^{S}, on recouvre une population d'ascospores au sein de laquelle les deux phénotypes sont représentés dans un rapport spécifique de la souche mutante utilisée. Cependant l'examen de méioses individuelles par analyse de tétrades révèle des phénomènes qui vous sont à présent devenus familiers. Voyons la séquence des événements qui se succèdent au cours d'un tel croisement (figure 21-13). Lorsque les cellules parentales fusionnent, le produit de cette fusion est un diploïde mais aussi un cytohet. Les cellules diploïdes peuvent alors se multiplier par la formation de bourgeons mitotiques. Durant la forma-

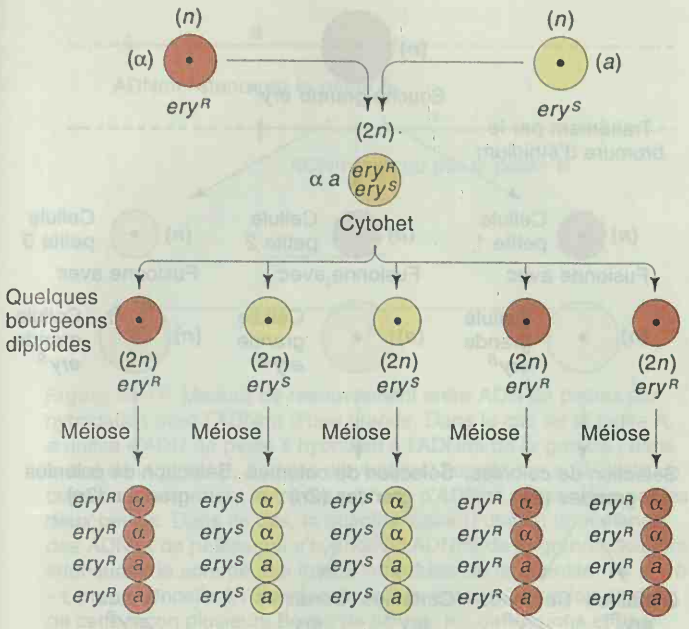


Figure 22-13. Le mode de transmission particulier que présentent certains phénotypes de résistance à des antibiotiques chez la levure. Lorsqu'on provoque la sporulation de cellules diploïdes (c'est-à-dire lorsqu'on induit la méiose) les produits de chaque méiose montrent un mode de transmission uniparental. (Seul un échantillon représentatif de diploïdes issus du zygote est figuré ici.) Notez que les gènes nucléaires, représentés ici par les allèles du type conjuguant *a* et *α* ségrègent d'une façon strictement mendélienne. Les allèles *ery*^{S} et *ery*^{R} déterminent respectivement la sensibilité et la résistance à l'érythromycine.

tion de ceux-ci, la ségrégation cytoplasmique se produit et les cellules filles deviennent soit *ery*^{R} soit *ery*^{S}. Par conséquent lorsqu'on induit la méiose en transférant les cellules sur un milieu approprié, tous les produits haploïdes issus d'une méiose, quelle qu'elle soit, sont identiques en ce qui concerne le phénotype érythromycine. Au niveau des méioses individuelles nous constatons donc une transmission uniparentale. (Notez que les allèles de type conjuguant a et *α* ségrègent toujours dans un rapport 1 : 1.) Toutes les mutations *ant*^{R} donnent des résultats analogues ce qui montre bien qu'elles ont leur siège dans un «génome extranucléaire».

La troisième classe importante, celle des mutants **mit$^-$**, fut la dernière à être découverte ; son étude a nécessité la mise au point de techniques de sélection particulières. Ces mutants ont ceci de commun avec les petites qu'ils forment des colonies de taille réduite et que le fonctionnement de leur chaîne de transporteurs d'électrons est anormal, mais ils s'en distinguent par une synthèse protéique normale et leur aptitude à réverser. Ces souches se présentent comme des petites qui seraient dues à des mutations ponctuelles. Leur mode de transmission est comparable à celui des mutants *ant*^{R}, c'est-à-dire une ségrégation cytoplasmique et une transmission uniparentale lors de la méiose.

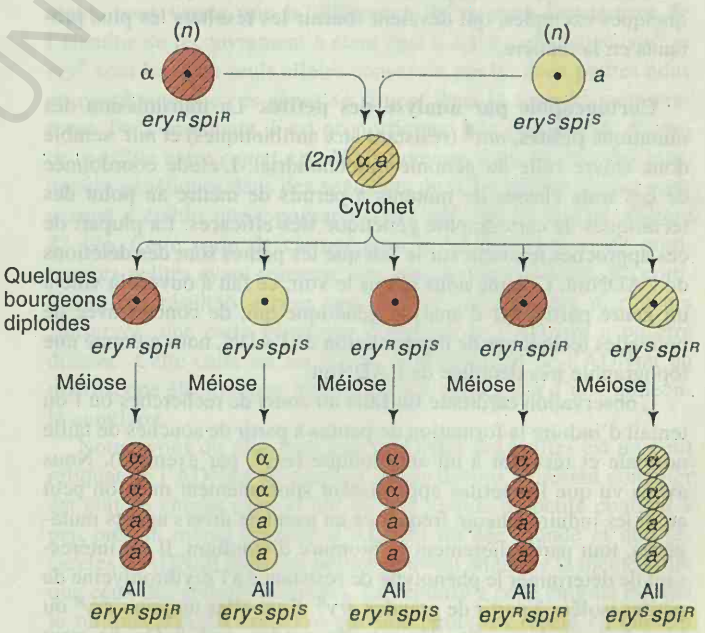
La cartographie du génome mitochondrial chez la levure

La démonstration que certains déterminants génétiques constituent un génome extranucléaire pose immédiatement la question de leur éventuelle connexion physique. Sont-ils tous liés sur un seul «chromosome mitochondrial» ou sont-ils situés sur des entités structurales distinctes ? Plusieurs approches différentes ont été suivies pour établir la carte du génome mitochondrial de la levure. Examinons quelques cas représentatifs des méthodologies mises en œuvre.

Cartographie par recombinaison. Pour mettre en évidence la formation de recombinants, nous pouvons commencer par des croisements entre parents différant par deux paires de gènes extranucléaires (une sorte de croisement «dihybride»). Par exemple effectuons le croisement *ery*^{R} *spi*^{R} × *ery*^{S} *spi*^{S}, laissons le diploïde produire plusieurs générations de bourgeons et provoquons enfin la sporulation. Déterminons ensuite le génotype de chaque bourgeon en observant le phénotype commun à toutes les ascospores qui en descendent.

Un tel croisement peut produire quatre génotypes (figure 21-15) et on les observe tous les quatre. Un croisement tiré d'une des premières expériences donnait :

ery^R *spi*^{R}	63 tétrades
ery^S *spi*^{S}	48 tétrades
ery^S *spi*^{R}	7 tétrades
ery^R *spi*^{S}	1 tétrade



Totaux des quatre génotypes

ery^R *spi*^{R}	63 tétrades	*ery*^{S} *spi*^{R}	7 tétrades
ery^S *spi*^{S}	48 tétrades	*ery*^{R} *spi*^{S}	1 tétrades

Figure 22-14. L'étude de la transmission dans un croisement entre cellules de levure différant par deux paires d'allèles déterminant respectivement la résistance ou la sensibilité à un antibiotique (*ery*^{R} = résistance à l'érythromycine ; *spi*^{R} = résistance à la spiramycine). Chaque bourgeon diploïde peut être classé comme parental ou recombinant sur la base de ces résultats. Notez que l'identité du génotype extranucléaire dans les quatre produits de la méiose confirme que la ségrégation et la recombinaison cytoplasmique doivent se produire pendant la formation des bourgeons diploïdes.

Les génotypes *ery*^{S} *spi*^{R} et *ery*^{R} *spi*^{S} sont naturellement ceux de recombinants produits pendant la formation des bourgeons diploïdes. (Notez que ces recombinants ne peuvent résulter d'une méiose puisque les produits de chaque méiose sont identiques en ce qui concerne le phénotype de résistance à l'antibiotique.)

Message Chez la levure la ségrégation cytoplasmique se produit pendant la formation des bourgeons chez les diploïdes à cytoplasme hétérozygote (cytohets). La ségrégation et/ou la recombinaison peuvent s'observer directement dans des cultures de bourgeons diploïdes ou parmi les produits méiotiques obtenus en déclenchant la sporulation des bourgeons.

A ce stade, nous semblons bien près d'établir une carte complète des gènes de levure impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Malheureusement, la cartographie par recombinaison s'est avérée d'une utilité fort limitée. En premier lieu, il est apparu que la recombinaison entre mitochondries était un phénomène de population, semblable à la recombinaison entre chromosomes de phages. En d'autres termes il se produit tant d'événements de recombinaison successifs que la plupart des gènes semblent non liés. La liaison n'est plus décelable qu'entre gènes très voisins. De plus, le processus de recombinaison est très fortement influencé par un facteur génétique particulier (le facteur ω, oméga) qui n'est présent que dans certains génomes mitochondriaux. Ce sont des méthodes moins classiques, dont nous allons à présent décrire quelques exemples, qui devaient fournir les résultats les plus probants en la matière.

Cartographie par analyse des petites. La transmission des mutations **petites,** *ant*^{R} (résistant aux antibiotiques) et *mit*$^-$ semble donc suivre celle du génome mitochondrial. L'étude coordonnée de ces trois classes de mutants a permis de mettre au point des techniques de cartographie génétique très efficaces. La plupart de ces approches reposent sur le fait que les petites sont des délétions de l'ADNmt. Comme nous allons le voir, ce fait a ouvert la voie à un genre particulier d'analyse génétique qui, de concert avec de nouvelles techniques de manipulation de l'ADN, nous a donné une topographie très détaillée de l'ADNmt.

L'observation cardinale fut faite au cours de recherches où l'on tentait d'induire la formation de petites à partir de souches de taille normale et résistant à un antibiotique (*ery*^{R}, par exemple). Nous avons vu que les petites apparaissent spontanément mais on peut aussi les induire à haute fréquence en usant de divers agents mutagènes, tout particulièrement le bromure d'éthidium. Il est intéressant de déterminer le phénotype de résistance à l'érythromycine de petites isolées à partir de grandes *ery*^{R}. Sont-elles toujours *ery*^{R} ou bien la mutation petite les a-t-elle rendus *ery*^{S} ? On ne peut répondre à cette question de manière directe parce qu'un phénotype de résistance aux antibiotiques ne peut être testé chez des petites.

Toutefois les ressources de la génétique nous donnent les moyens de contourner cette difficulté. Nous combinons les petites induites avec une grande *ery*^{S} pour former des diploïdes que nous laissons bourgeonner. Suivant le type de petite utilisée se formeront des proportions variables de bourgeons diploïdes donnant naissance à des petites ou à des grandes. Ce sont les grandes qui nous intéressent ici puisque leur phénotype de résistance *peut* être déterminé. Si les petites induites ont conservé la résistance, on s'attend à ce que certaines de ces grandes diploïdes l'aient acquis. En fait, les bourgeons diploïdes donnant des colonies de taille normale obtenus à partir de certaines petites sont de deux phénotypes : *ery*^{S} (provenant de la grande *ery*^{S} haploïde) et *ery*^{R} (qui doit provenir de la petite haploïde). Ce résultat indique que seuls les déterminants génétiques du phénotype grande sont perdus lors de l'événement mutationnel qui produit ces types de petites ; les déterminants de la résistance à l'antibiotique ne sont pas affectés par la mutation petite.

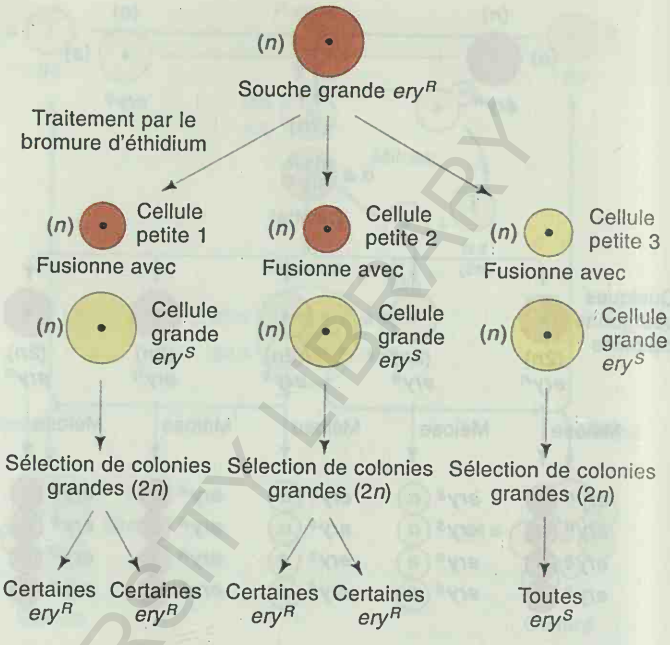


Figure 22-15. La rétention ou la perte d'un marqueur de résistance à un antibiotique (*ery*^{R}) lorsqu'on induit la formation de mutants petites à partir d'une culture de cellules grandes et résistantes. Le phénotype de résistance ne peut se reconnaître chez une petite de sorte que toute résistance qui subsiste doit être «sauvée» (*rescued,* en anglais) par le biais d'un croisement avec une grande sensible à l'antibiotique. On peut alors examiner le phénotype de résistance des bourgeons diploïdes. Dans les exemples figurés ici, la résistance est conservée par les petites 1 et 2 mais, durant la formation de la petite 3, la résistance et le déterminant du phénotype grande ont été perdus tous les deux.

Cependant, la catégorie de petites qui, après leur fusion avec une grande *ery*^{S} donne naissance à des diploïdes de taille normale et tous *ery*^{S}, est d'un intérêt tout particulier. Dans ce cas, en effet, la mutation responsable du phénotype petite semble inactiver ou détruire le déterminant du phénotype grande et celui de la résistance à l'antibiotique. La perte simultanée de plusieurs déterminants génétiques est une caractéristique des délétions. De fait on sait à présent que le phénotype de ces petites résulte de délétions importantes dans l'ADNmt.

La découverte de la perte de marqueurs chez les petites est intéressante pour deux raisons. En premier lieu, puisque la mutation petite altère l'ADNmt et cause la perte d'un gène, on peut sans crainte de se tromper situer ce gène dans l'ADNmt. La procédure représentée sur la figure 22-16 est devenue un test de routine pour détecter une mutation mitochondriale.

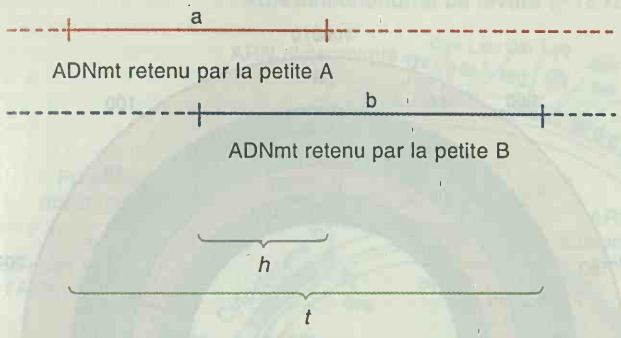


Figure 22-16. Mesure de recouvrement entre ADN de petites par hybridation avec l'ADNmt d'une grande. Dans le cas de la petite A, *a* unités d'ADN de petite s'hybrident à l'ADNmt de la grande ; dans le cas de la petite B, *b* unités s'hybrident. Supposons qu'il existe un certain recouvrement entre les portions d'ADNmt conservées par les deux petites. Dans ce cas, la quantité totale (*t* unités) du mélange des ADNmt de petites qui s'hybride à l'ADNmt de la grande doit être inférieure à la somme des totaux individuels de la quantité $h = a + b - t$, proportionnelle à l'étendue du recouvrement. Lorsqu'on étudie de cette façon plusieurs paires de petites, les dimensions et positions relatives de ces différents ADNmt peuvent être corrélées avec l'information dont on dispose au sujet des gènes conservés par chaque paire de manière à pouvoir dresser une carte du génome mitochondrial.

Message Un bon test opérationnel pour repérer un gène situé dans l'ADNmt est la perte de ce marqueur au cours de l'induction de petites.

En deuxième lieu, la perte de marqueurs chez les petites a permis de mettre au point plusieurs techniques cartographiques. L'une utilise une souche de grandes résistant à plusieurs antibiotiques, par exemple ery^R cap^R oli^R spi^R. On peut induire des petites dans cette souche et déterminer quels marqueurs de résistance sont retenus par ces mutants. (Bien sûr ce test implique que l'on «sauve» — *rescue*, en anglais — ces marqueurs par le biais d'un croisement avec une cellule grande et sensible aux antibiotiques, comme nous l'avons vu plus haut.) Il devient alors relativement facile de comparer les fréquences avec lesquelles diverses paires de gènes de résistances sont perdues ou conservées, ce qui nous permet de repérer ceux qui sont étroitement liés. On peut exploiter la même idée dans une autre technique de cartographie qui combine l'approche génétique à une approche physique. On commence par induire deux souches de petites à partir d'une grande à résistances multiples. Par exemple, supposez que la souche A soit restée cap^R, ery^R et par^R tandis que la souche B ait conservé les marqueurs cap^R, ery^R, oli^R et ana^R. On extrait l'ADN de chacune des souches et on le dénature. On hybride alors cet ADN à un échantillon d'ADN de référence provenant d'une grande ; ces hybridations se font de deux manières : soit individuellement, avec l'ADN d'une des deux souches (A ou B) soit avec un mélange des deux (A et B). Supposez que la quantité hybridée soit *a* dans le cas de l'ADN A, *b* pour B et t pour le mélange A + B.

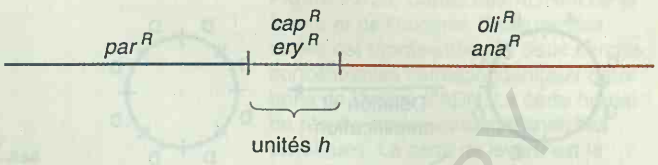


Figure 22-17. On peut corréler les marqueurs génétiques conservés par certaines petites avec leurs régions d'homologie réciproque. Puisque l'induction de petites provoque la délétion d'une partie de l'ADNmt, différentes petites conserveront des gènes différents. Dans l'exemple figuré, une petite conserve cap^R, ery^R et par^R tandis qu'une autre conserve cap^R, ery^R, oli^R et ana^R. Les loci *cap* et *ery* doivent se trouver dans la région de recouvrement de dimension *h*, ainsi que l'indiquent les expériences d'hybridation moléculaire. Les loci *par, oli* et *ana* doivent se trouver en dehors de cette région et leurs positions relatives peuvent se déduire de l'analyse d'autres paires de petites. De cette manière, une carte de marqueurs génétiques peut être dressée.

Anthony Linnane a utilisé ces valeurs pour mesurer le degré de recouvrement (h) des délétions au phénotype petite. D'après la figure 22-16, nous voyons que si les segments d'ADN conservés (non détruits par la délétion) chez les deux petites possèdent une région commune, la quantité d'ADN hybridée à partir du mélange sera moindre que la somme des quantités hybridées à partir des ADN individuels. En fait si vous regardez ce schéma attentivement, vous verrez que la différence (h) dépend directement de l'étendue du recouvrement *h* étant égal à $a + b - t$. Puisque cap^R et ery^R sont les deux seuls allèles conservés par les deux petites nous en concluons que ces gènes se situent dans la zone de recouvrement. Par conséquent, *h* est proportionnel à la plus grande distance possible entre *cap* et *ery*. Nous pouvons donc insérer des marqueurs génétiques dans des segments de taille définie ce qui nous permet d'établir une topographie très détaillée et précise. (figure 22-17). Cette sorte de cartographie a été appliquée à de nombreuses petites ayant conservé des régions bien définies. En combinant ces résultats à ceux que fournit l'analyse des marqueurs conservés, une carte génétique complète de l'ADNmt a pu être dressée. Cette carte est un cercle. L'observation de l'ADNmt au microscope électronique montre qu'il s'agit en fait d'une molécule annulaire.

Nous avons dit plus haut que l'ADNmt des petites est un petit reliquat de l'ADNmt du sauvage. Nous devons à présent concilier cet état de choses avec le fait qu'une cellule de petite contient à peu près la même quantité d'ADNmt qu'une grande et que les cercles d'ADNmt issus des petites peuvent atteindre la même taille que ceux des cellules normales. La réponse à cette énigme est que le reliquat d'ADN conservé par une petite est répété en tandem autant de fois qu'il le faut pour constituer un ADNmt de taille à peu près normale (figure 22-18). Ce modèle ne requiert aucun changement à notre interprétation des déterminations de recouvrement.

Dès que la structure d'un jeu de délétions au phénotype petite a été résolue, elle peut s'avérer très utile pour d'autres expériences de cartographie. Par exemple, la carte de nombreux mutants mit^- a pu être dressée à partir de fusions entre ces mutants et plusieurs petites bien déterminées. Si la mutation mit^- se trouve dans la région de l'ADNmt conservée par le mutant petite, une substitution de l'ADNmit^- par l'ADN de la petite peut survenir à la suite d'une recombinaison et la cellule recombinée sera capable de croître aux dépens d'une source d'énergie non fermentescible.

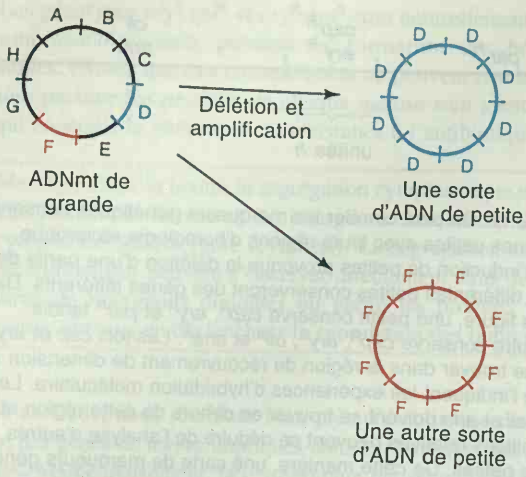


Figure 22-18. Lors de l'induction d'une petite à partir d'une grande, il se peut qu'une partie considérable de l'ADNmt soit détruite. Dans ce cas la région d'ADN conservée par la petite (D ou F dans les exemples figurés) est amplifiée en tandem jusqu'à constituer un chromosome de longueur à peu près normale.

Message La perte ou la rétention de marqueurs pendant l'induction de mutants «petites» et le recouvrement de délétions «petites» sont à la base de nouvelles techniques génétiques utilisées pour dresser la carte des génomes mitochondriaux.

Cartographie basée sur l'analyse par enzymes de restriction. Les enzymes de restriction peuvent servir à cartographier l'ADNmt et l'ADNcp. La carte (figure 22-19) indique les sites d'action des enzymes utilisés.

Un exemple particulièrement lumineux de cartographie d'ADNmt par restriction concerne les ARN (ARNt et ARNr) mitochondriaux dont les gènes respectifs sont représentés par un seul exemplaire. On utilisera un ARN marqué par un précurseur radioactif comme sonde afin de l'hybrider par la méthode de Southern (voir page 443) avec une suspension d'ADN «digérée» par une enzyme de restriction. La bande hybride qu'une autoradiographie pourra révéler fournira l'emplacement approximatif du gène de l'ARN considéré. Par d'autres expériences analogues utilisant différents enzymes de restriction on serrera de plus en plus près les limites de la région où s'effectue l'hybridation jusqu'à pouvoir définir un locus précis sur l'ADNmt.

Qu'en est-il des gènes *ant*^{R} et *mit*$^-$? Une approche de cette question consiste à corréler les fragments de restriction conservés chez un certain nombre de petites avec, par exemple, les marqueurs de résistance aux antibiotiques également conservés chez ces souches. De cette manière, il est possible d'établir une relation directe entre certains marqueurs et certaines régions de l'ADNmt, telles qu'elles peuvent être définies par les séquences cibles des enzymes de restriction. Une autre approche consiste à prendre une petite ne conservant qu'un seul gène de résistance (par exemple *ery*^{R}), à en extraire l'ADNmt et à l'utiliser comme sonde sous forme de copies radioactives. On peut alors procéder à son hybridation avec divers fragments de restriction, ce qui permettra de localiser la portion d'ADNmt conservée par la petite examinée, c'est-à-dire le locus *ery*. Par exemple si l'ARNc de la petite *ery*^{R} s'hybride avec le fragment X découpé par un enzyme de restriction et avec le fragment Y découpé par un autre, on en conclura que le locus *ery* se trouve dans la région de recouvrement de ces deux fragments.

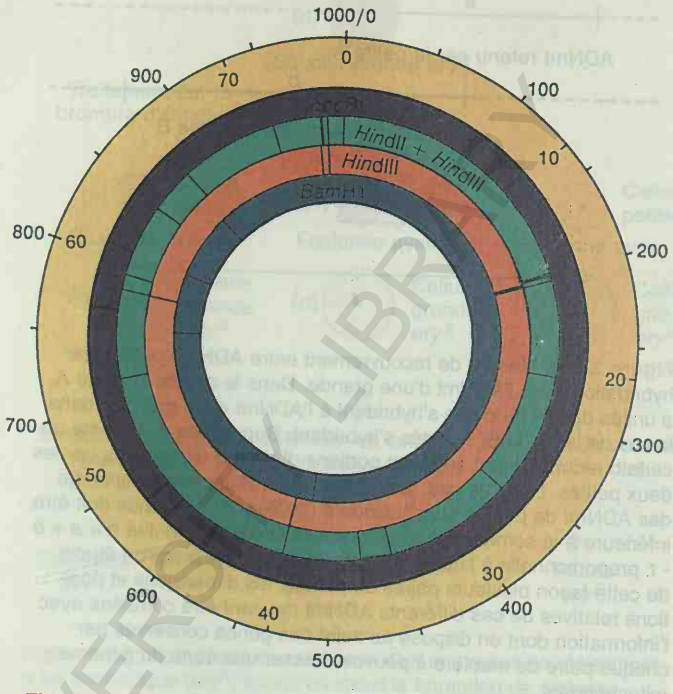


Figure 22-19. Carte montrant les sites d'action de divers enzymes de restriction sur l'ADNmt de la levure. A l'extérieur une échelle arbitraire de 0 à 1000 ; sur le même périmètre, mais à l'intérieur, les nombres balisent l'ADN en kilobases ($n \times 1000$ nucléotides). Les quatre bandes concentriques intérieures indiquent les fragments produits lorsque l'ADN est digéré par certains enzymes de restriction : *EcoRI*, *HindII + HindIII*, *HindIII* et *BamHI*. La position du point zéro est arbitraire. (D'après J.P.M. Sanders et al., «The Organization of Genes in Yeast Mitochondrial DNA, III». *Molecular and General Genetics* 157, 1977.)

Une vue d'ensemble du génome mitochondrial

De nombreuses régions de la carte mitochondriale de la levure ont fait l'objet d'analyses encore plus détaillées, telles que leur séquençage et l'identification des introns. L'état actuel de nos connaissances en la matière, résultat des approches que nous avons décrites, est représenté sur la figure 22-20. A titre de comparaison, nous y avons inclus la carte de l'ADNmt humain. Les différents gènes de levure discutés dans ce chapitre y sont mentionnés ainsi que les protéines correspondantes. Nous pouvons voir que les phénotypes *cap*^{R}, *ery*^{R} et *spi*^{R} correspondent en fait à des altérations du long ARNr et que *par*^{R} touche l'ARNr court. D'autres mutations *ant*^{R} telles que *oli*^{R} sont corrélées à des altérations de différentes sous-unités de l'ATPase. Par contre, les mutations *mit*$^-$ se trouvent affecter plusieurs sous-unités de la cytochrome oxydase (I-III) ou le cytochrome *b*. Plusieurs autres gènes sont indiqués aussi, tels que ceux des ARNt de la mitochondrie et un gène de protéine ribosomique.

Cette carte contient aussi quelques surprises. La plus saillante est la présence d'introns dans plusieurs gènes. Celui de la sous-unité I de la cytochrome oxydase n'en contient pas moins de neuf !

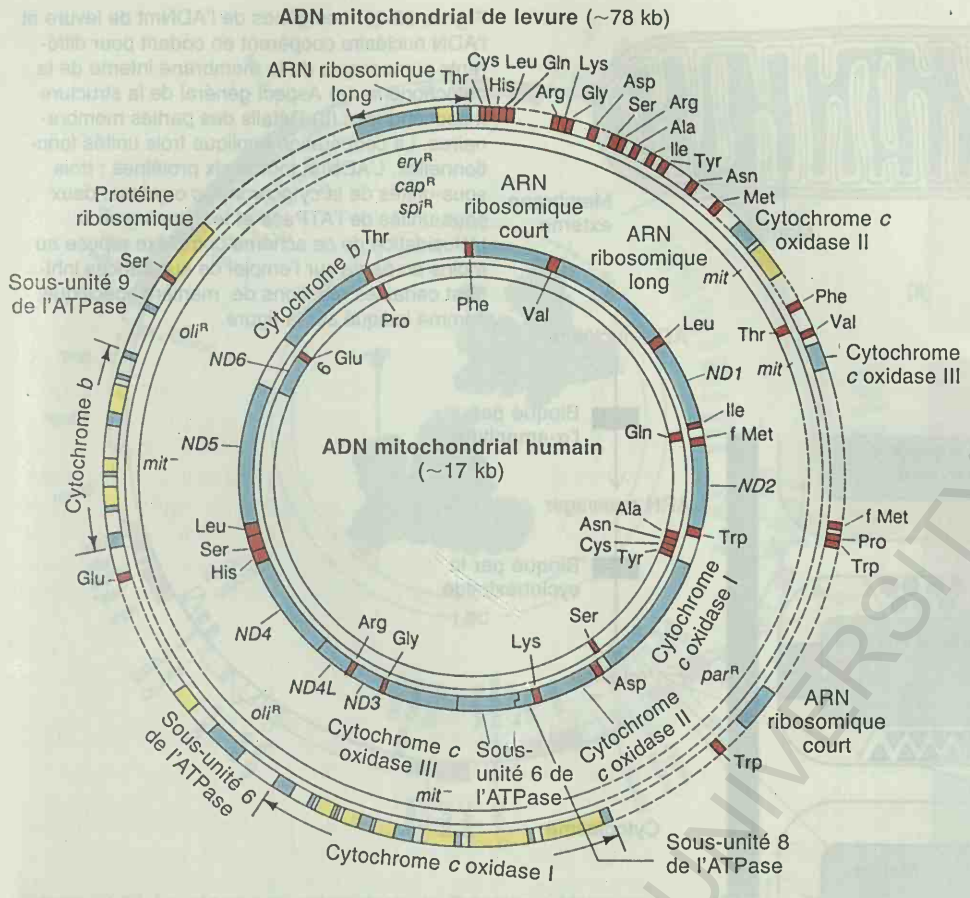


Figure 22-20. Cartes des ADNmt de la levure et de l'homme. Chacune des cartes est représentée par deux cercles concentriques correspondant aux deux brins de l'hélice d'ADN. La carte humaine résulte exclusivement d'analyses physiques. La carte de levure est le fruit d'analyses génétiques et physiques, comme discuté dans le texte. Notez que les mutants utilisés au cours de l'analyse génétique de la levure figurent vis-à-vis de leurs gènes de structure respectifs. En bleu = exons et gènes d'une pièce, en rouge = ARNt, en jaune = URF (cadres de lecture non attribués). Les gènes d'ARNt sont indiqués par les abréviations des acides aminés correspondants ; les gènes ND codent pour des sous-unités de la déshydrogénase du NADH. (NOTE : la carte humaine n'est pas tracée à la même échelle que la carte de levure.)

La découverte d'introns dans les gènes mitochondriaux est particulièrement surprenante parce qu'il y en a relativement peu dans les gènes nucléaires de la levure. Une autre surprise est la présence de longs cadres de lecture non attribués (URF pour «unassigned reading frames»). Ce sont des séquences qui débutent par un codon initiateur correct et ne sont pas interrompues par des codons d'arrêt. Ces «gènes en quête d'une fonction» sont l'objet de recherches intensives. Certains URFs occupent une partie d'un intron et semblent coder pour des protéines impliquées dans l'épissage des introns eux-mêmes au niveau de l'ARN. Notez que l'ADNmt humain est beaucoup plus court et plus compact dans son organisation. Il semble contenir moins d'ADN intercalaire.

Cette vue générale du génome mitochondrial fait ressortir ses deux fonctions principales : il code pour quelques protéines qui font partie ou sont associées à la chaîne des transporteurs d'électrons, ainsi que pour quelques unes des protéines, tous les ARNt et les deux ARNr requis pour assurer la synthèse protéique mitochondriale. Mais il est frappant que pour chacun de ces processus les autres composants nécessaires sont codés par des gènes nucléaires dont les ARNm sont traduits par des ribosomes cytosoliques et dont les produits sont transportés jusque dans les mitochondries (voyez la figure 22-21). La raison de cette division du travail entre l'ADN mitochondrial et l'ADN nucléaire n'est pas connue. Autre fait curieux : certaines sous-unités sont codées par l'ADNmt chez un organisme mais par l'ADN nucléaire chez un autre. De toute évidence un transfert d'information doit pouvoir se produire entre ces organites. Il existe aussi des indices qu'un tel transfert se produise entre mitochondries et chloroplastes. De plus, des pseudogènes inactifs similaires à certains gènes mitochondriaux ont été repérés dans le noyau.

En tout, ce sont 25 gènes d'ARNt de la levure et 22 de l'homme qu'indiquent les cartes de la figure 22-20. Ces ARNt se chargent de toute la synthèse protéique mitochondriale. Ce nombre est bien moindre que le minimum de 32 requis pour assurer la traduction des ARNm nucléaires. Cette économie est assurée par une souplesse accrue dans le flottement normalement permis lors de l'appariement anticodon-messager (voir figure 13-19). Les spécificités de codage des ARNt de l'homme sont indiquées dans la figure 22-22. Notez que les attributions de codons sont quelquefois différentes de celles qui caractérisent le code nucléaire. On sait aussi qu'il existe des différences entre les mitochondries de différentes espèces. Dès lors il est clair que le code n'est pas universel contrairement à ce qu'on avait supposé pendant longtemps.

A présent que les ADNmt de la levure, de l'Homme et de plusieurs autres espèces ont été séquencés, l'étude d'autres ADNmt s'en trouve facilitée vu le degré de conservation de ces séquences au cours de l'évolution. On se sert de gènes clonés d'ADNmt de la levure ou de l'Homme comme sondes pour localiser rapidement le gène correspondant sur la carte de restriction d'un ADNmt provenant d'un organisme quelconque.

Message L'ADNmt comprend des gènes codant pour des éléments indispensables à la synthèse protéique mitochondriale (surtout de l'ARNr et t) et pour certaines sous-unités de protéines intervenant dans la synthèse d'ATP. Les régions les moins bien comprises sont les introns, les cadres de lecture non attribués et l'ADN intercalaire.

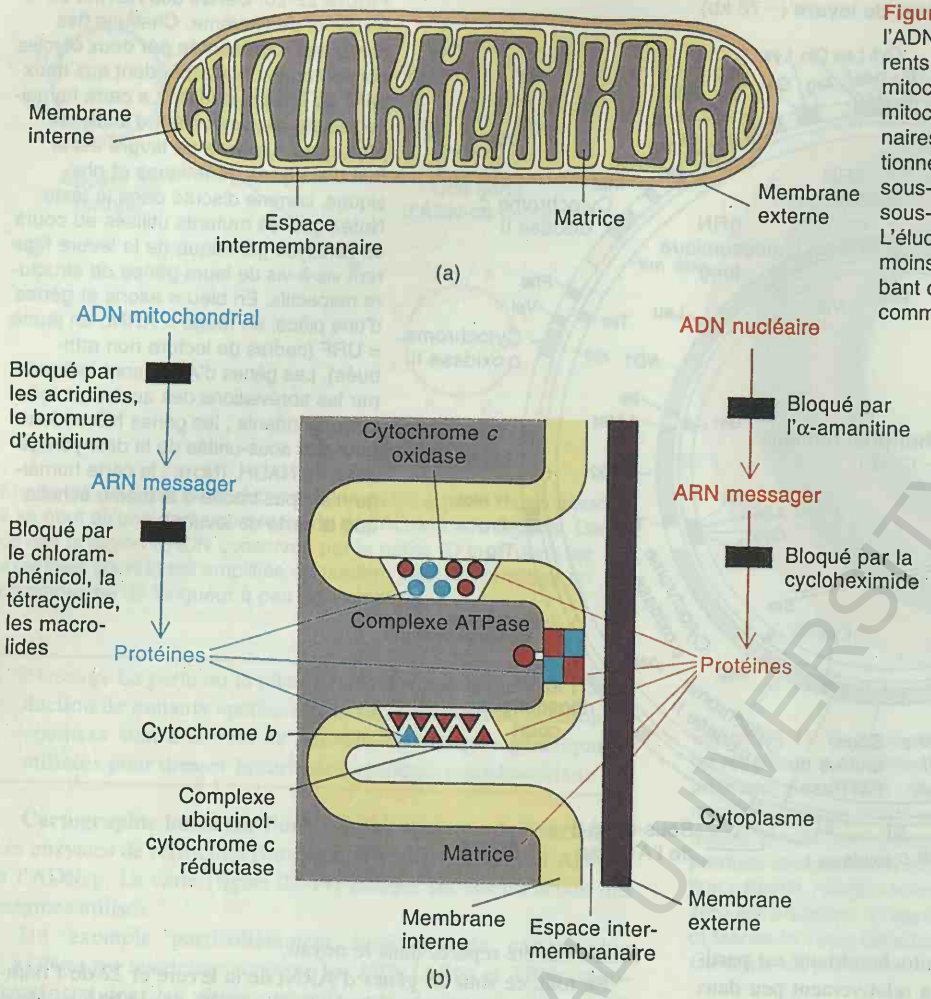


Figure 22-21. Les gènes de l'ADNmt de levure et l'ADN nucléaire coopèrent en codant pour différents composants de la membrane interne de la mitochondrie. (a) Aspect général de la structure mitochondriale. (b) Détails des parties membranaires. La coopération implique trois unités fonctionnelles. L'ADNmt fournit six protéines : trois sous-unités de la cytochrome-*c* oxydase, deux sous-unités de l'ATPase et le cytochrome *b*. L'élucidation de ce schéma complexe repose au moins en partie sur l'emploi de substances inhibant certaines réactions de manière spécifique, comme indiqué sur la figure.

Première lettre	Deuxième lettre				Troisième lettre
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	*Stop*	(*Stop*) Trp	A
	Leu	Ser	*Stop*	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile (Met)	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	(Ile) Met	Thr	Lys	(Arg) *Stop*	A
	Met	Thr	Lys	(Arg) *Stop*	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Figure 22-22. Le code génétique de la mitochondrie humaine. Les 22 cases correspondant à des codons non-*stop* indiquent les fonctions des 22 types d'ARNt.

Une vue d'ensemble du génome chloroplastique

Bien que plusieurs notions de base de l'hérédité chloroplastique découlent du type d'analyse génétique dont nous avons suivi le déroulement chez *Mirabilis* et *Chlamydomonas*, notre vision présente de l'organisation de l'ADNcp est principalement le fruit d'études moléculaires. En fait, les séquences de ADNcp de plusieurs espèces sont à présent connues. La figure 22-23 reprend l'exemple de l'hépatique *Marchantia polymorpha*.

La taille des molécules d'ADNcp des espèces végétales se situe d'habitude entre 120 et 200 kb. Chez *Marchantia*, elle est de 121 kb. La figure 22-23 indique la fonction de la plupart des gènes de cet ADNcp. Cependant, le séquençage de 121.000 nucléotides ne nous précise pas automatiquement quels gènes sont alignés sur

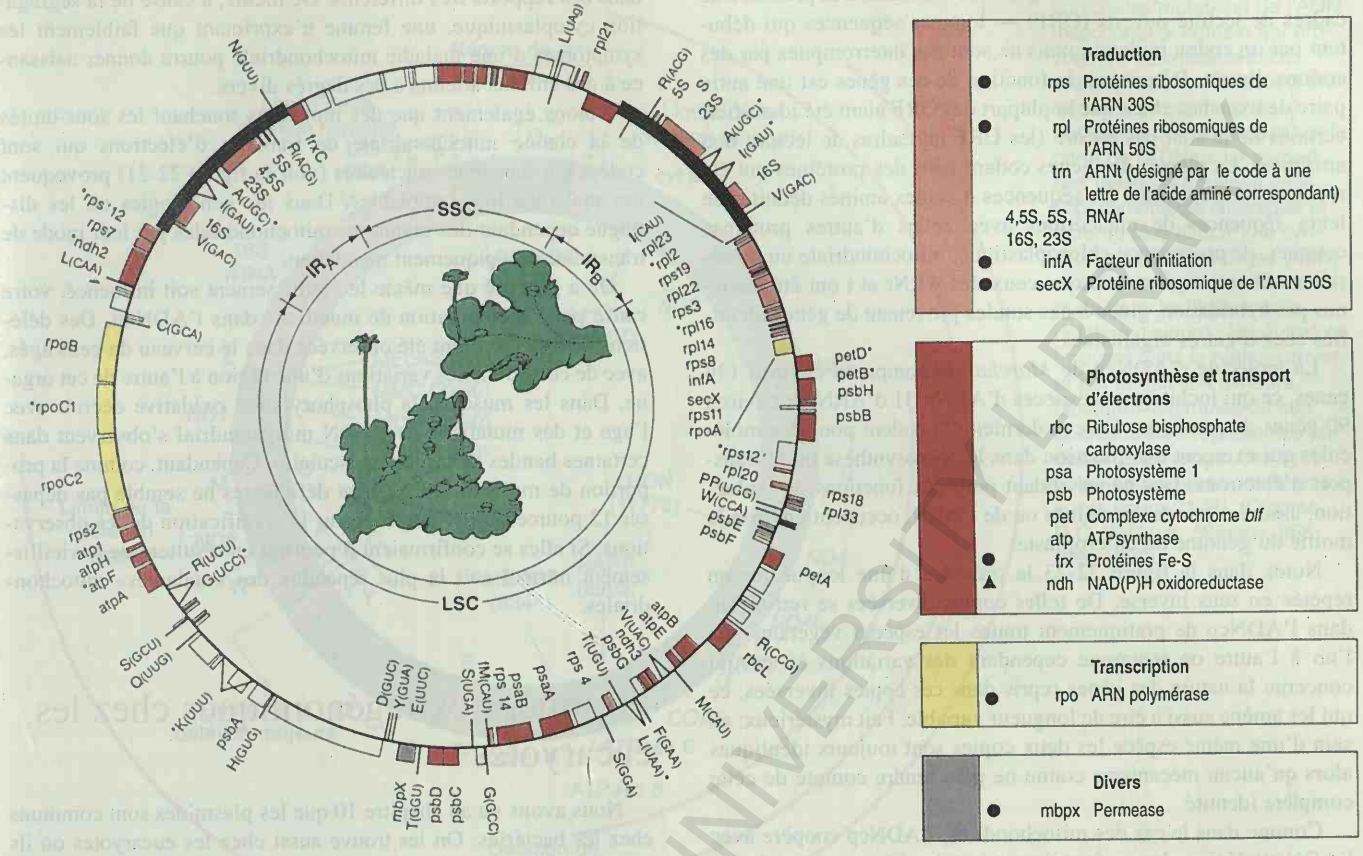


Figure 22-23. Le génome du chloroplaste de l'hépatique *Marchantia polymorpha*. IR_A et IR_B, LSC et SSC (cercle intérieur) indiquent respectivement les copies inversées et les régions uniques de grande et de petite taille. Les gènes indiqués du côté intérieur sont transcrits dans le sens des aiguilles d'une montre, les autres dans le sens inverse. Les gènes de l'ARNr présents dans les régions IR sont respectivement représentés par 16S, 23S, 4.5S et 5S. Les gènes des ARNt sont indiqués conformément au code à une lettre des acides aminés et par l'anticodon non modifié. Les gènes de protéines sont indiqués par des symboles génétiques ; les cadres restants représentent des ORF non identifiés, à peu près à l'échelle. Les gènes contenant des introns sont désignés par des astérisques. Les cadres de différents tons tout autour de la carte donnent un aperçu des fonctions identifiées à ce jour ; les groupes de fonctions analogues sont indiqués par des tons différents, les ORF sont en couleur. Les gènes identifiés sur la base de leur homologie avec ceux des génomes de bactéries ou de mitochondries sont respectivement indiqués ● et ▲. Le dessin central représente les formes mâle (au-dessus) et femelle (au-dessous) d'une plante de *Marchantia*. Les anthéridies et les archégones sont dressées au sommet de tiges spéciales au-dessus du thalle, qui contient les chloroplastes. *Marchantia* peut aussi se reproduire asexuellement ; des disques de tissu vert (les gemmes ou propagules) se développent au fond des structures en forme de coupe sur la surface du thalle. Arrivées à maturité, les propagules se libèrent du thalle et se développent en nouveaux gamétophytes. (D'après K. Umesono et H. Ozeki, *Trends in Genetics* 3, 1987.)

Figure 22-24. Des mutations dans des gènes nucléaires peuvent aussi provoquer la formation de feuilles blanches. Dans le cas présent, une plante de maïs verte *Cc*, hétérozygote pour un allèle récessif produisant des feuilles albinos, a été autofécondée ; la descendance était pour 1/4 *cc* et complètement albinos. Comme ces plantes albinos ne photosynthétisent pas, elles meurent dès que les réserves nutritives de la graine (accumulées par la plante mère) sont épuisées. De telles mutations peuvent affecter soit la synthèse de la chlorophylle elle-même, soit l'une ou l'autre protéine d'origine nucléaire qui interagit avec les protéines d'origine chloroplastique pour produire un assemblage photosynthétique fonctionnel. (Anthony Griffiths).

BC UNIVERSITY LIBRARY

cette molécule. La présence de gènes se reconnaît à la présence de cadres de lecture ouverts (ORF) — longues séquences qui débutent par un codon initiateur mais ne sont pas interrompues par des codons d'arrêt. Déterminer la fonction de ces gènes est une autre paire de manches : bien que la plupart des ORF aient été identifiés, certains ne le sont pas encore (les URF ou cadres de lecture non attribués). La plupart des gènes codant pour des protéines ont été reconnus en comparant les séquences d'acides aminés déduites de leurs séquences de nucléotides avec celles d'autres protéines connues, de provenance chloroplastique, mitochondriale ou bactérienne. D'autres gènes tels que ceux des ARNr et t ont été reconnus par hybridation, grâce à des sondes provenant de gènes identifiés chez d'autres organismes.

La molécule d'ADNcp de *Marchantia* comprend environ 136 gènes, ce qui inclut quatre espèces d'ARNr, 31 d'ARNt et environ 90 gènes de protéines. De ces derniers 20 codent pour des molécules qui exercent une fonction dans la photosynthèse ou le transport d'électrons. Des gènes codant pour des fonctions de traduction, assurées par des protéines ou de l'ARN, occupent environ la moitié du génome du chloroplaste.

Notez dans la figure 22-23 la présence d'une longue région répétée en sens inverse. De telles copies inversées se retrouvent dans l'ADNcp de pratiquement toutes les espèces végétales. De l'un à l'autre on remarque cependant des variations en ce qui concerne la nature des gènes repris dans ces copies inversées, ce qui les amène aussi à être de longueur variable. Fait mystérieux: au sein d'une même espèce les deux copies sont toujours identiques alors qu'aucun mécanisme connu ne peut rendre compte de cette complète identité.

Comme dans le cas des mitochondries, l'ADNcp coopère avec l'ADN nucléaire, chacun fournissant certaines des sous-unités des protéines fonctionnant à l'intérieur de l'organite. Les composantes d'origine nucléaire sont traduites dans le cytosol et transportées dans le chloroplaste ou elles s'assemblent avec les composantes synthétisées de l'organite. Les mutations qui affectent les composantes nucléaires des complexes photosynthétiques sont transmises sur le mode mendélien (figure 22-24).

Maladies mitochondriales chez l'Homme

Plusieurs maladies humaines sont dues à des mutations de l'ADN mitochondrial. Toutes affectent les gènes codant pour les sous-unités protéiques qui composent la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons et provoquent donc des déficiences dans la production d'ATP mitochondrial. Les personnes porteuses de ces mutations présentent des **cytopathies mitochondriales**, maladies caractérisées par diverses combinaisons de déficiences atteignant le cerveau, le coeur, les muscles, les reins et le foie.

Ces mutations peuvent être ponctuelles ou consister en délétions, voire en duplications de l'ADN mitochondrial, comme le représente la figure 21-25. Comme on pouvait s'y attendre les cytophaties mitochondriales se transmettent suivant le mode propre aux mutations mitochondriales. En premier lieu, cette transmission s'opère d'une génération à l'autre via la mère exclusivement. En deuxième lieu lorsque ces mutations sont réunies en combinaisons hétéroplasmiques, elles ségrègent sur le mode cytoplasmique. Ainsi, une personne possédant un mélange de mitochondries normales et anormales formera par ségrégation cytoplasmique des cellules pourvues de ces deux types d'organites dans des rapports très différents. De même, à cause de la ségrégation cytoplasmique, une femme n'exprimant que faiblement les symptômes d'une maladie mitochondriale pourra donner naissance à des enfants atteints à des degrés divers.

Notons également que des mutations touchant les sous-unités de la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons qui sont codées par des gènes nucléaires (voir la figure 22-21) provoquent des maladies très semblables. Dans les généalogies on les distingue cependant des mutations mitochondriales par leur mode de transmission typiquement mendélien.

On a proposé que même le vieillissement soit influencé, voire causé par l'accumulation de mutations dans l'ADNmt. Des délétions de l'ADNmt ont été observées dans le cerveau de gens agés, avec de considérables variations d'une région à l'autre de cet organe. Dans les muscles, la phosphorylation oxidative décroît avec l'age et des mutations de l'ADN mitochondrial s'observent dans certaines bandes de la fibre musculaire. Cependant, comme la proportion de molécules d'ADNmt déficientes ne semble pas dépasser 12 pourcent on s'interroge sur la signification de les observations. Si elles se confirmaient il pourrait en résulter que le vieillissement normal soit la plus répandue des «maladies» mitochondriales.

Plasmides extragénomiques chez les eucaryotes

Nous avons vu au chapitre 10 que les plasmides sont communs chez les bactéries. On les trouve aussi chez les eucaryotes où ils sont cependant moins fréquents. Comme les plasmides ne sont en général pas associés aux chromosomes nucléaires ils peuvent présenter un mode de transmission non mendélien semblable par certains aspects à celui des ADN d'organites.

La plupart des plasmides eucaryotiques n'expriment aucun phénotype et ne se détectent qu'avec l'aide de techniques moléculaires. Le mieux connu est le «cercle de deux microns» (2-μ) de la levure. Ce plasmide circulaire se trouve probablement dans le nucléoplasme. Si l'on fusionne une souche haploïde contenant ce plasmide avec une autre qui ne le possède pas, toute la descendance (sexuelle ou non) tend à en rester pourvue. Bien que sa fonction demeure énigmatique, le plasmide 2-μ joue un rôle majeur dans la biologie moléculaire de la levure parce qu'il a été manipulé de manière à pouvoir servir de vecteur génétique chez cet organisme (voir chapitre 15). Lorsqu'on insère de l'ADN nucléaire dans le vecteur 2-μ et qu'on l'utilise ensuite pour transformer une souche réceptrice, l'insert se retrouve dans le noyau où il peut éventuellement s'incorporer aux chromosomes par divers mécanismes de recombinaison.

Cependant, la plupart des plasmides eucaryotiques sont mitochondriales. Un cas intéressant et bien étudié est celui dont la présence est corrélée avec la stérilité mâle chez le maïs. Ce phénomène est très important en agriculture. Les plantes qui sont affectées de stérilité mâle ne produisent pas de pollen fonctionnel. Quand on féconde des plantes affectées de stérilité mâle par du pollen de plantes normales, toute la descendance se retrouve affectée de stérilité mâle , et le mode de transmission de cette propriété est exclusivement maternel. De fait, le type de stérilité mâle le plus étudié chez le maïs est associé à la présence de deux plasmides linéaires, S1 et S2, qui se trouvent dans la mitochondrie en plus de l'ADNmt. Le rôle exact joué par S1 et S2 dans le développement de la stérilité mâle n'est pas élucidé entièrement bien que les propriétés moléculaires de ces plas-

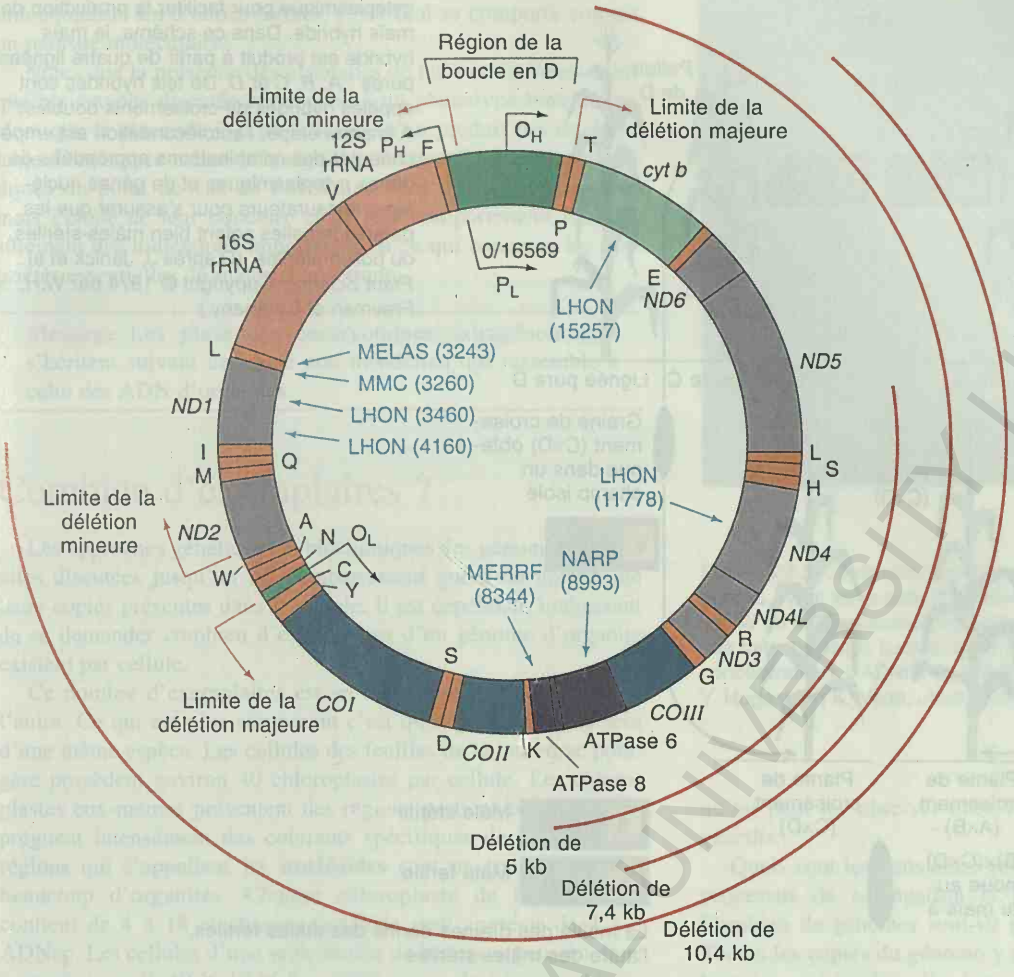


Figure 22-25. Localisation des principales mutations de l'ADN mitochondrial humain qui provoquent des maladies. Les mutations ponctuelles sont indiquées par le numéro du nucléotide correspondant sur la carte de l'ADNmt. La plupart des délétions trouvées dans l'ophtalmoplégie chronique et externe plus (CEOP), le syndrome de Kearns-Sayre (KSS) et celui de Pearson sont contenues dans les limites de la délétion majeure ; les autres se trouvent dans la région couverte par la délétion mineure. Quelques exemples de ces délétions sont représentés par des arcs en rouge. Les symboles génétiques sont définis sur la figure 21-20. (D'après D.C. Wallace, *Science*, 256, 629, 1992).

Gènes du complexe I (NADH dehydrogenase)
Gènes du complexe III (ubiquinol : cytochrome *c* oxidoreductase)
Gènes d'ARNt
Gènes du complexe IV (cytochrome *c* oxidase)
Gènes du complexe V (ATP synthase)
Gènes d'ARNr

O_H et O_L Origines de réplication sur les fibres H et L de l'ADNmt
P_H et P_L Promoteur

Maladies :

MERRF	Epilepsie myoclonique
LHON	Neuropathie optique héréditaire de Leber
NARP	Faiblesse musculaire neurogène, ataxie et retinitis pigmentosum
MELAS	Encéphalomyopathie mitochondriale, acidose lactique et symptomes apoplectiques
MMC	Myopathie et cardiomyopathie héritée de la mère

mides soient bien connues. Une propriété intéressante de ces plasmides est leur aptitude à recombiner avec l'ADNmt.

On exploite la stérilité mâle chez le maïs et chez d'autres plantes cultivées pour faciliter la production de graines hybrides lors de croisements entre lignées génétiquement différentes ; de telles graines produisent généralement des plantes plus grandes et plus vigoureuses. Dans la recherche d'hybrides, il importe de contrecarrer l'autofécondation, qui interfère avec la production des graines désirées. La stérilité mâle peut donc se révéler très utile puisque l'absence de pollen fonctionnel qui en résulte, empêche l'autopollinisation. Un schéma de croisement est illustré par la figure 22-26.

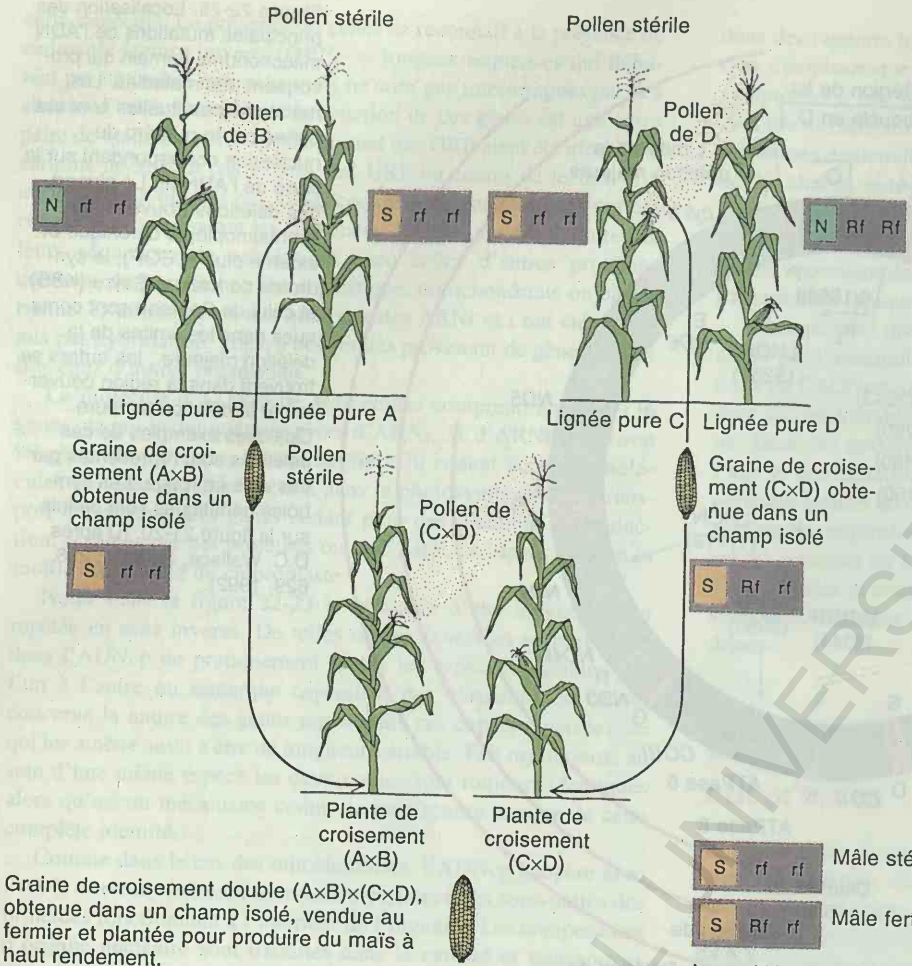


Figure 22-26. Utilisation de la stérilité mâle cytoplasmique pour faciliter la production de maïs hybride. Dans ce schéma, le maïs hybride est produit à partir de quatre lignées pures : *A, B, C* et *D*. De tels hybrides sont appelés hybrides de croisements doubles. A chaque étape, l'autofécondation est empêchée par des combinaisons appropriées de gènes cytoplasmiques et de gènes nucléaires restaurateurs pour s'assurer que les parents femelles soient bien mâles-stériles ou pollen-stériles. (D'après J. Janick et al., *Plant Science*. Copyright © 1974 par W.H. Freeman and Company.)

Notre dernier exemple de plasmide eucaryotique sera celui du déterminant de la sénescence chez *Neurospora*. La plupart des souches de *Neurospora* ne vieillissent pas et continuent à croître tant que l'apport nutritif est suffisant. Cependant, certaines populations contiennent des individus sénescents. L'une d'elles provient d'Hawaii où ces souches ont été dénommées «kalilo», un mot hawaïen qui signifie «aux portes de la mort». En croissant, le mycélium des souches kalilo ne progressera que jusqu'à un certain point puis mourra. Cependant si l'on croise ces souches avant leur mort, on s'aperçoit que cette tendance à s'éteindre fait l'objet d'une transmission maternelle. Le déterminant de la sénescence est un plasmide linéaire de 9 kb appelé ADNkal. Ce plasmide peut se propager de manière autonome et en toute innocuité dans le cytoplasme, mais le déclenchement de l'issue fatale est précédé par l'insertion de l'ADNkal dans l'ADN mitochondrial. Au moment de la mort la plupart des ADNmt contiennent un insert d'ADNkal complet (figure 22-27). On pense que la mort survient

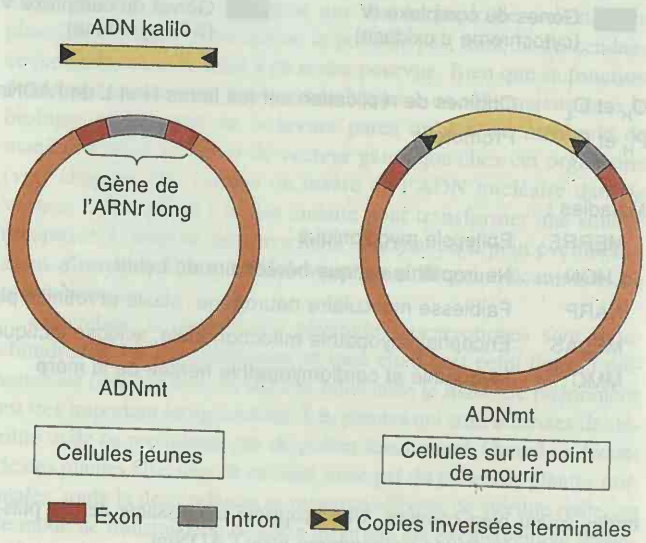


Figure 22-27. Chez *Neurospora*, la sénescence est associée à l'insertion d'un plasmide linéaire appelé ADN kalilo dans l'ADNmt. L'insertion figurée ici se produit dans l'intron d'un gène d'ARNr mais d'autres sites d'insertion sont connus.

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

parce que l'ADNkal interfère avec le fonctionnement normal de la mitochondrie. En d'autres termes, l'ADNkal se comporte comme un parasite moléculaire.

Notez que la présence des plasmides de maïs et de *Neurospora* que nous avons discutés correspond à un phénotype bien défini, alors que le plasmide 2-μ de la levure n'en produit pas de décelable. L'existence même et la signification des plasmides eucaryotiques du point de vue de l'évolution sont encore mystérieuses mais l'étude de leur structure et de leur comportement fournira sûrement des indications importantes en ce qui concerne les propriétés essentielles du matériel génétique.

Message Les plasmides eucaryotiques extragénomiques s'héritent suivant un mode non mendélien qui ressemble à celui des ADN d'organites.

Combien d'exemplaires ?

Les approches génétiques et biochimiques des génomes d'organites discutées jusqu'ici ne s'embarrassent guère du nombre de leurs copies présentes dans la cellule. Il est cependant intéressant de se demander combien d'exemplaires d'un génome d'organite existent par cellule.

Ce nombre d'exemplaires est en fait variable d'une espèce à l'autre. Ce qui est plus surprenant c'est qu'il peut varier au sein d'une même espèce. Les cellules des feuilles de la betterave potagère possèdent environ 40 chloroplastes par cellule. Les chloroplastes eux-mêmes présentent des régions particulières qui s'imprègnent intensément des colorants spécifiques de l'ADN ; ces régions qui s'appellent les **nucléoïdes** sont un trait commun à beaucoup d'organites. Chaque chloroplaste de betterave en contient de 4 à 18 et chaque nucléoïde peut contenir de 4 à 8 ADNcp. Les cellules d'une seule feuille de betterave peuvent donc contenir jusqu'à $40 \times 18 \times 8 = 5760$ copies du génome chloroplastique ! Bien que *Chlamydomonas* n'ait qu'un seul chloroplaste par cellule, ce dernier peut contenir 500 à 1500 molécules d'ADNcp, habituellement regroupées en nucléoïdes.

Qu'en est-il des mitochondries ? Une cellule haploïde de levure «typique» peut renfermer de 1 à 45 mitochondries, chacune contenant 10 à 30 nucléoïdes, avec 4 ou 5 molécules par nucléoïde. La figure 22-28 montre les nucléoïdes mitochondriaux tels qu'on peut les observer chez l'organisme unicellulaire *Euglena gracilis*.

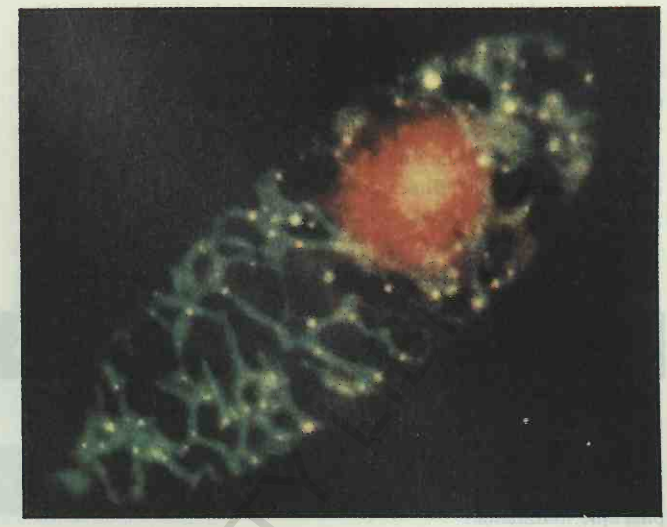


Figure 22-28. Coloration par fluorescence d'une cellule d'*Euglena gracilis*. Avec les substances utilisées, le noyau paraît rouge à cause de la fluorescence de grandes quantités d'ADN nucléaire. Les mitochondries fluorescent en vert et au sein de celles-ci les concentrations d'ADNmt (nucléoïdes) fluorescent en jaune. (D'après Y. Hugashi et K. Veda, *Journal of Cell Science* 93, 565, 1989).

Quels sont les liens entre cette multiplication génomique et le processus de ségrégation et recombinaison cytoplasmique ? Combien de génomes sont-ils présents au début du processus ? Toutes les copies du génome y sont-elles impliquées ? La recombinaison se produit-elle lors d'une fusion d'organites et les nucléoïdes doivent-ils fusionner aussi ? Comment le processus peut-il ségréger les nombreuses copies du génome dispersées dans la cellule ? A l'heure actuelle il n'existe que peu d'éléments de réponses à ces questions. La situation ressemble à celle que connaissaient les pionniers de la génétique qui discernaient les gènes et leurs groupes de liaison mais ignoraient tout de leurs liens avec le phénomène de la méiose.

RÉSUMÉ

Le génome extranucléaire s'ajoute au génome nucléaire des organismes eucaryotiques examinés au cours des chapitres précédents. L'existence de ce génome se reconnaît au niveau génétique surtout par la transmission uniparentale de phénotypes mutants. Au niveau cellulaire, une combinaison d'approches génétiques et biochimiques a démontré que le génome extranucléaire est de l'ADN d'organite — soit de mitochondrie (ADNmt), soit de chloroplaste (ADNcp). Chez les hétéroplasmons (c'est-à dire à cytoplasme mixte) les différents «allèles» des déterminants génétiques d'organites ségrègent pour produire des secteurs tissulaires différents (par exemple des panachures vertes et blanches chez les plantes) ou des cellules aux phénotypes différents.

L'ADNmt de levure est l'ADN d'organite le mieux compris. Il code pour les composants du processus de traduction propre à la mitochondrie et aussi pour certains composants des enzymes respiratoires que l'on trouve normalement dans les membranes mitochondriales. Les mutations qui affectent les composants de l'appareil de traduction sont caractérisées souvent par des phénotypes de résistance à certains antibiotiques ; celles qui affectent les enzymes respiratoires le sont par des phénotypes d'insuffisance respiratoire.

L'ADN chloroplastique est plus long et aussi plus complexe que l'ADNmt. Les mutations qui affectent l'ADNcp sont caractérisées par des déficiences photosynthétiques ou la résistance à certains antibiotiques.

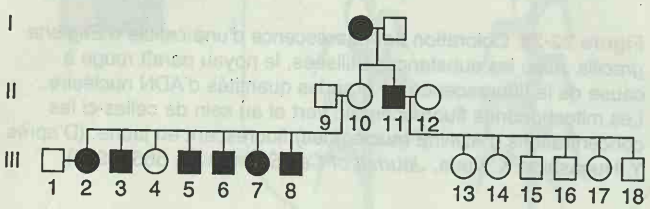
Les gènes d'organites n'ont été examinés à peu près complètement que chez un nombre réduit d'organismes ; cependant ces études nous ont mis en main des techniques d'analyse génétique dont l'application devrait pouvoir s'étendre à l'étude des génomes extranucléaires de nombreux autres organismes. Des gènes clonés de l'ADNmt de la levure ou de l'Homme, ou encore de l'ADNcp de Marchantia sont utilisés comme sondes pour reconnaître les gènes homologues chez des organismes moins bien étudiés.

Certaines maladies humaines, assez rares heureusement, sont dues à des mutations dans l'ADNmt. L'accumulation de déficiences génétiques dans l'ADNmt peut contribuer au processus de vieillissement.

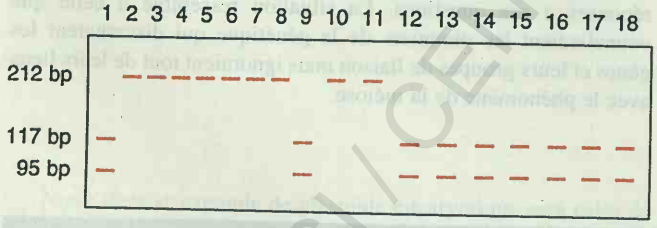
Les plasmides eucaryotiques sont des éléments extragénomiques qui sont également transmis de façon non mendélienne. La plupart se trouvent dans les mitochondries.

PROBLÈME SYNTHÉTIQUE

1. La généalogie humaine ci-dessous concerne une rare anomalie visuelle : la vision centrale est perdue mais la vision périphérique maintenue.



a. De quel mode de transmission héréditaire s'agit-il ? Peut-on expliquer cette généalogie par hérédité nucléaire ? Par hérédité mitochondriale ? Des généticiens moléculaires ont analysé l'ADN mitochondrial de 18 membres des générations II et III. Un fragment de 212 p.b. obtenu par restriction à partir de chacune de ces personnes a été digéré par une autre enzyme de restriction, *Sfa* N1, ce qui a donné les résultats suivants



b. Quel est le mode de transmission héréditaire dévoilé par ces fragments ?

c. Quel rapport se manifeste-t-il entre le mode de transmission héréditaire de ces fragments et celui de la maladie ?

d. Comment expliquer les individus 4 et 10 ?

e. Quelle est la nature probable de la mutation ?

f. Comment les résultats de cette analyse pourraient-ils être utilisés pour conseiller cette famille sur le plan génétique ?

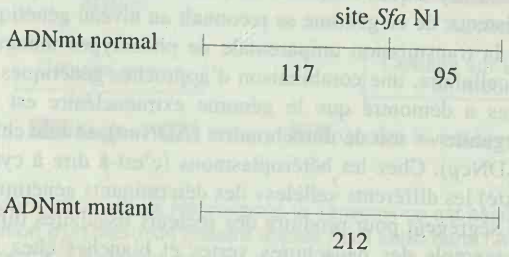
Solution

a. Sur la base de la seule généalogie il paraît possible mais cependant peu probable que la maladie soit due à un allèle nucléaire dominant. En effet, nous devrions invoquer un manque de pénétrance chez l'individu 10 qui devrait être porteur de l'allèle puisque celui-ci, une femme, le transmet à sa descendance. En outre nous devons expliquer les rapports de la génération III. Les unions 9 × 10 et 11 × 12 devraient être du type *Aa* × *aa*, le rapport phénotypique affectés/normaux chez les enfants de chaque famille devant alors être 1 : 1. L'hypothèse de l'allèle nucléaire dominant n'est donc pas satisfaisante.

Les résultats peuvent aussi s'expliquer par hérédité maternelle. Les individus 4 et 10, cependant, requièrent une explication particulière. Une fois de plus nous pourrions invoquer un manque de pénétrance mais nous pouvons tout aussi bien envisager une ségrégation cytoplasmique ; nous avons vu que les cellules peuvent contenir des mélanges de déterminants cytoplasmiques (mitochondriaux dans ce cas-ci) normaux et anormaux, et que la ségrégation cytoplasmique peut en modifier le rapport d'une cellule à l'autre. La mère de la première génération aurait alors été hétéroplasmique et aurait, par hasard, transmis une majorité de mitochondries normales à sa fille (le n° 10) qui n'exprime pas l'anomalie. Celle-ci, suite à une modification du rapport dans l'autre sens, aurait transmis surtout des mitochondries anormales à six de ses sept enfants.

b. Les profils de restriction indiquent clairement une hérédité maternelle, comme on peut s'y attendre avec de l'ADN mitochondrial.

c. Il existe une corrélation manifeste entre la présence du fragment de 212 p.b. et l'anomalie. Si la même corrélation devait être observée dans d'autres généalogies similaires, on pourrait formuler l'hypothèse que la mutation responsable cause la perte d'un site de restriction *Sfa* N1.



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

d. L'hypothèse que les individus 4 et 10 soient des hétéroplasmons est maintenant moins attirante parce que dans ce cas, où mitochondries normales et anormales seraient présentes dans la même cellule, on devrait trouver chez certains membres de la famille des profils de restriction à trois bandes -95,117 et 212- alors qu'aucun n'a été observé. Par conséquent l'explication la plus probable est une pénétrance incomplète de la maladie mitochondriale.

e. En accord avec l'hypothèse mitochondriale la mutation serait très vraisemblablement une substitution de paire de nucléotides puisque, si la mutation affecte le site *Sfa*N1, elle ne provoque ni gain ni perte de nucléotides ; en effet 117 + 95 = 212.

f. Si l'hypothèse était confirmée par des études ultérieures, l'apparition du fragment de 212 p.b. après digestion par *Sfa*N1 pourrait servir de marqueur permettant de diagnostiquer la mutation. Toute femme porteuse de ce marqueur pourrait transmettre la maladie à ses enfants, tandis que les hommes porteurs ne le pourraient pas.

Notons qu'en répondant aux questions nous avons fait appel en les combinant aux concepts d'hérédité mendélienne, d'hérédité cytoplasmique, de mutation et d'analyse de l'ADN par restriction. Le problème est basé sur une généalogie réelle de la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON) dont on pense qu'elle est de nature mitochondriale.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Chez une souche de *Chlamydomonas* de type conjuguant mt^+, survient une mutation qui empêche la souche de croître aux températures supérieures normalement tolérées. On croise ce mutant avec le sauvage et on obtient une descendance entièrement sensible à la température. Que pouvez-vous en conclure au sujet de cette mutation ?

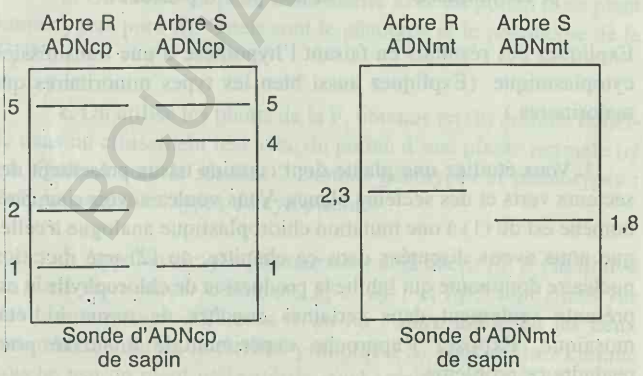
Solution

Puisque la mutation est apparue dans une souche mt^+ le croisement doit avoir été le suivant :

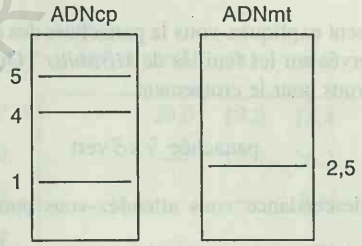
$$mt^+, ts \times mt^-, ts^+$$

Quant à la descendance elle doit avoir été mt^+, *ts* et mt^-, *ts*. Ceci est un cas bien clair de transmission uniparentale à partir d'un parent mt^+ vers la descendance entière. Chez *Chlamydomonas,* ce mode de transmission est typique des gènes de l'ADN du chloroplaste. Ce dernier doit donc être le siège de la mutation *ts*.

2. Comme l'évolution tend à conserver certaines séquences, on observe des similitudes entre ADN d'organites chez un large spectre d'organismes. Par conséquent, les sondes obtenues à partir d'un organisme s'hybrident souvent à l'ADN d'autres espèces. Vous prenez deux sondes, l'une provenant de l'ADNcp d'un sapin, l'autre de son ADNmt, et vous les hybridez par la technique de Southern avec les ADNcp et mt (clivés par restriction) de deux pins, R et S, utilisés comme parents dans un croisement. Vous obtenez les autoradiogrammes suivants (les nombres indiquent des kb) :



Du croisement R♀×S♂, on isole 20 descendants. Ils donnent tous les mêmes profils d'hybridation avec les deux sondes, à savoir :



a. Expliquez les profils d'hybridation de la sonde chez les parents et les descendants.

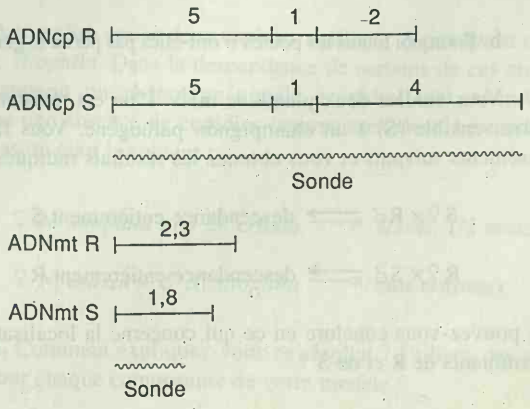
b. Expliquez les résultats obtenus pour les descendants. Comparez-les avec les résultats discutés dans ce chapitre en faisant ressortir d'éventuelles divergences.

c. Que prédiriez-vous pour le croisement S♀×R♂ ?

(NOTE : ce problème s'inspire de résultats obtenus chez plusieurs espèces de conifères).

Solution

a. Pour l'ADNcp aussi bien que l'ADNmt, la quantité totale d'ADN hybridée par la sonde est différente chez les plantes R et S. Dès lors nous pouvons représenter l'ADN par exemple comme suit (d'autres arrangements des fragments restent possibles) :



BCU Lausanne - UNIL UNIVERSITY LIBRARY

Les sondes révèlent donc un polymorphisme de restriction probablement neutre pour l'ADNcp et mt. Ces profils polymorphiques sont d'utiles marqueurs d'organite dans les croisements.

b. Nous voyons que toute la descendance a reçu son ADNmt du parent maternel R puisque chez tous la sonde s'hybride avec le même fragment d'ADNmt R. Nous devions nous y attendre vu la prédominance des cas de transmission maternelle rencontrée tout au long de ce chapitre. Cependant l'ADNcp semble être transmis par le parent paternel exclusivement puisque toute la descendance exhibe le profil 5/4/1 du parent paternel S. C'est un résultat surprenant mais c'est la seule explication possible des données. En fait, chez tous les gymnospermes étudiés à ce jour l'ADNcp est transmis par le parent paternel. La cause de ce phénomène est inconnue mais il contraste avec le mode de transmission adopté par les angiospermes.

c. Pour ce croisement nous pouvons prédire que toute la descendance aura le profil 5/2/1 en ce qui concerne l'ADNcp et la bande maternelle d'1,8 kb quant à l'ADNmt.

PROBLÈMES

1. Comment les génomes d'organites et du noyau coopèrent-ils au niveau protéique ?

2. Citez et décrivez deux tests du mode de transmission cytoplasmique.

3. Comment expliquez-vous la panachure des couleurs verte et blanche observée sur les feuilles de *Mirabilis* ? Quelle descendance prédisez-vous pour le croisement :

panachée ♀×♂ vert

et à quelle descendance vous attendez-vous pour le croisement réciproque ?

4. Chez *Neurospora*, le mutant *stp* exhibe une croissance erratique faite d'arrêts et de redémarrages. Le siège de la mutation est l'ADNmt. Si vous croisez un parent femelle *stp* avec une souche normale comme mâle, à quelle descendance vous attendez-vous ? Qu'en serait-il du croisement réciproque ?

5. Si vous croisez une levure contenant une mutation de résistance à un antibiotique sise dans l'ADNmt et que vous analysez les tétrades produites, quel type d'asques prédisez-vous en ce qui concerne le marqueur de résistance ?

6. Vous obtenez une nouvelle mutation de résistance à un antibiotique (ant^R) dans une souche de levure. Vous traitez des cellules au génotype ant^R par le bromure d'éthidium et vous obtenez des petites. Certaines de celles-ci ont perdu le déterminant ant^R.

a. Que pouvez-vous conclure en ce qui concerne la localisation du gène ant^R ?

b. Pourquoi toutes les petites n'ont-elles pas perdu le gène ant^R ?

7. Vous étudiez deux plants de maïs. L'un est résistant (R) et l'autre sensible (S) à un champignon pathogène. Vous faites les croisements suivants et vous obtenez les résultats indiqués :

S♀× R♂ ⟶ descendance entièrement S

R♀× S♂ ⟶ descendance entièrement R

Que pouvez-vous conclure en ce qui concerne la localisation des déterminants de R et de S ?

8. Chez *Chlamydomonas*, une certaine sonde détecte un polymorphisme de restriction dans l'ADNcp. Deux profils sont décrits :

Profil 1 : deux bandes, longueurs 2 et 3 kb

Profil 2 : deux bandes, longueurs 3 et 5 kb

Si vous effectuez les croisements suivants :

mt^+ profil 1 × mt^- profil 2

mt^+ profil 2 × mt^- profil 1

à quels types de descendants vous attendez-vous ? N'oubliez pas de tracer un schéma des deux types d'ADN avec leurs sites de restriction. Faites-en autant pour les autoradiogrammes.

9. Considérez le croisement de levure suivant, dihybride pour deux gènes mitochondriaux impliqués dans la résistance à des antibiotiques :

$$MATa\ oli^R\ cap^R \times MAT\alpha\ oli^S\ cap^S$$

(*MATa* et *MATα* sont les allèles du type conjuguant chez la levure). Quels types de tétrades ce croisement produira-t-il ?

10. Chez le genre *Antirrhinum*, un phénotype de feuille jaunâtre appelé «prazinizan» (pr) s'hérite de la manière suivante :

normal♀× pr♂ ⟶ 41 203 normaux + 13 panachés

pr♀× normal♂ ⟶ 42 235 pr + 8 panachés

Expliquez ces résultats en faisant l'hypothèse d'une transmission cytoplasmique. (Expliquez aussi bien les types minoritaires que majoritaires.)

11. Vous étudiez une plante dont certains tissus présentent des secteurs verts et des secteurs blancs. Vous voulez savoir si ce phénomène est dû (1) à une mutation chloroplastique analogue à celles que nous avons discutées dans ce chapitre, ou (2) une mutation nucléaire dominante qui inhibe la production de chlorophylle et est présente seulement dans certaines couches de tissus à l'état mosaïque. Exposez l'approche expérimentale à suivre pour résoudre ce problème.

BOU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

12. Une variante naine de tomate apparaît dans une lignée. On la croise comme femelle avec des plantes normales et toute la F_1 est naine. On laisse ces individus s'autoféconder ; toute la F_2 qui en résulte est normale. Chacun des individus F_2 subit une autofécondation ; la F_3 ainsi produite est au 3/4 normale et 1/4 naine. Peut-on expliquer ces résultats par : a) une transmission cytoplasmique ? b) une transmission cytoplasmique et un ou des gènes nucléaires suppresseurs ? c) un effet maternel s'exerçant sur le zygote ? Justifiez vos réponses.

13. Supposez que la plante diploïde A ait un cytoplasme génétiquement différent de celui de la plante B. Pour étudier les relations nucléo-cytoplasmiques vous désirez obtenir une plante avec le cytoplasme de la plante A et, comme génome nucléaire, principalement celui de la plante B. Comment vous y prendrez-vous ?

14. On croise deux espèces d'épilobes (*Epilobium*) de manière réciproque :

♀ *E. luteum* × ♂ *E. hirsutum* ⟶
descendance toute de très grande taille

♀ *E. hirsutum* × ♂ *E. luteum* ⟶
descendance toute de très petite taille

On croise en retour des descendants du premier croisement en tant que femelles avec *E. hirsutum* et on continue ainsi pendant 24 générations successives. A la fin de ce programme, la descendance reste entièrement de grande taille, comme les hybrides initiaux.

a. Interprétez les croisements réciproques.

b. Expliquez pourquoi l'on a procédé à ce programme de croisements en retour.

15. Une forme de stérilité mâle du maïs est transmise maternellement. Croisés avec du pollen normal les plants d'une lignée mâle-stérile donne des descendants mâles-stériles. En outre, l'on sait que certaines lignées de maïs possèdent un allèle restaurateur nucléaire et dominant (*Rf*) qui restaure la fertilité pollinique chez les lignées mâles-stériles.

a. Des recherches ont montré que l'introduction du gène restaurateur dans une lignée mâle-stérile n'affecte pas le maintien des facteurs cytoplasmiques de la stérilité mâle. A votre avis quel genre de résultats expérimentaux ont-ils permis d'arriver à cette conclusion ?

b. On croise un plant mâle-stérile avec du pollen d'un plant homozygote pour *Rf*. Quels sont le génotype et le phénotype de la F_1 ?

c. On utilise les plants de la F_1 obtenus en (b) comme femelle dans un croisement test avec du pollen d'une plante normale (*rf rf*). Quel en sera le résultat ? Donnez génotypes et phénotypes ; indiquez aussi les types de cytoplasme.

d. Appelons le gène restaurateur déjà décrit *Rf-1*. On trouve un autre restaurateur dominant, *Rf-2*. *Rf-1* et *Rf-2* sont situés sur des chromosomes différents. L'un ou l'autre allèle ou les deux ensemble confèrent la fertilité pollinique. Si vous utilisez comme souche test un plant mâle-stérile, quel serait le résultat d'un croisement dont le parent mâle serait :

(i) hétérozygote aux deux loci restaurateurs ?

(ii) homozygote dominant à l'un des deux et homozygote récessif à l'autre ?

(iii) hétérozygote à l'un des deux et homozygote récessif à l'autre ?

(iv) hétérozygote à l'un des deux et homozygote dominant à l'autre ?

16. Un traitement par la streptomycine induit la formation de mutants résistant à la streptomycine chez *Chlamydomonas*. Au cours de divisions mitotiques ultérieures, certaines des cellules filles produites par l'un des mutants retourne au phénotype normal. Suggérer une explication plausible de ce phénomène.

17. On essaie de cartographier par coségrégation quatre marqueurs chloroplastiques de *Chlamydomonas* : *m1, m2, m3* et *m4*. On considère les marqueurs 2 par 2 en situation hétérozygote et on obtient les fréquences de coségrégation suivantes :

	m1	*m2*	*m3*	*m4*
m1	—	29,0	18,0	18,4
m2		—	10,9	26,2
m3			—	8,8
m4				—

(Par exemple, *m1* et *m2* coségrègent dans 29 pour cent des divisions cellulaires examinées). Dressez une carte génétique rudimentaire sur la base de ces résultats.

18. Chez *Aspergillus,* un mycélium de couleur rougeâtre apparaît chez une souche haploïde. Vous construisez un hétérocaryon avec un haploïde de couleur normale qui requiert l'acide para-aminobenzoïque (PABA) comme facteur de croissance. A partir de cet hétérocaryon, vous obtenez quelques sous-cultures qui exigent le PABA et sont rouges, ainsi que plusieurs autres phénotypes. Que déduisez-vous de ces informations en ce qui concerne le gène déterminant le phénotype rouge ?

19. A la page 668, nous décrivons une expérience où l'on injecte des mitochondries anormales dans des cellules normales de *Neurospora.* Le texte dit que des «contrôles appropriés» ont été effectués. Quels sont ceux que vous utiliseriez ?

20. Adrian Srb croisa deux espèces voisines : *Neurospora crassa* et *N. sitophila.* Dans la descendance de certains de ces croisements apparut un phénotype appelé aconidial (ac), terme qui implique une absence de conidies (spores asexuées). Le mode de transmission était le suivant :

♀ *N. sitophila* × ♂ *N. crassa* ⟶ 1/2 ac, 1/2 normaux

♀ *N. crassa* × ♂ *N. sitophila* ⟶ tous normaux

a. Comment expliquez-vous ce résultat ? Utilisez des symboles pour chaque composante de votre modèle.

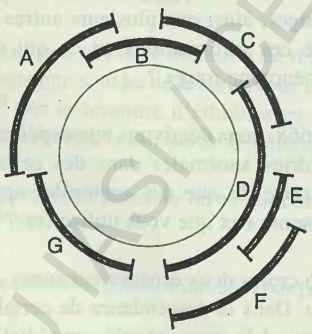
b. De quels parent(s) les déterminants génétiques du phénotype ac proviennent-ils ?

c. Comment se fait-il qu'aucun des parents n'était ac ?

21. De nombreux croisements ont été effectués entre souches de *Neurospora* (A, B, C, D, E) porteuses ou non d'un allèle du type poky. Expliquez les résultats des croisements suivants et attribuez des symboles génétiques à chacune des souches utilisées. (NOTE : la souche poky D se comporte exactement comme la souche A dans tous les croisements).

Croisement	Descendance
a. non poky B♀ × poky A♂	entièrement non poky
b. non poky C♀ × poky A♂	entièrement non poky
c. poky A♀ × non poky B♂	entièrement poky
d. poky A♀ × non poky C♂	1/2 poky, tous identiques (par exemple, D) ; 1/2 non poky, tous identiques(par exemple, E)
e. non poky E♀ × non poky C♂	entièrement non poky
f. non poky E♀ × non poky B♂	1/2 poky ; 1/2 non poky

22. L'ADNmt de sept petites cytoplasmiques a été étudié par analyse de restriction. L'ADN subsistant chez chacune de ces petites peut-être représenté par les arcs du schéma suivant. Dix mutants *mit*⁻ ont été fusionnés avec chacune des petites pour produire des cytohets et des cellules provenant de cultures de ces derniers ont été étalées sur un milieu de croissance standard. Parmi les 70 combinaisons, certaines ne produisirent que des colonies au phénotype petite (voir signe- dans le tableau suivant) mais le reste montra des colonies grandes et petites (voir + dans le tableau). Utilisez ces résultats pour localiser approximativement les positions de l'ADNmt qui ont muté pour donner les cultures *mit*⁻ originales.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+
B	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−
C	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−
D	−	−	−	−	+	−	+	+	−	−
E	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
F	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
G	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

Décomposons le problème

a. Qu'est-ce que l'ADNmt ?

b. Représentez une molécule d'ADNmt en y indiquant au moins cinq gènes propres à l'ADNmt.

c. Qu'est-ce qu'une petite cytoplasmique ?

d. Quelle est la nature d'une petite cytoplasmique au niveau de l'ADN ?

e. Pourquoi représenter l'ADN d'une petite par un arc de cercle ?

f. Expliquez succinctement comment vous pourriez déterminer ce qu'il reste d'ADN dans une petite en effectuant une analyse par enzymes de restriction.

g. Qu'est-ce qu'un mutant *mit*⁻ ? Qu'est-ce qu'un tel mutant par rapport à une petite ? Faites le schéma d'un mutant *mit*⁻ d'une petite et d'une grande.

h. Les mutants *mit*⁻ sont-ils résistant à des antibiotiques ?

i. Qu'est-ce qu'un cytohet ? Donnez-en un autre exemple. Donnez un synonyme de cytohet ou inventez vous-même un terme qui corresponde au concept.

j. Comment construire les cytohets dans cette expérience ? Des marqueurs d'auxotrophie seraient-ils utiles ?

k. Dans quel sens utilise-t'on le terme «fusionné» dans l'énoncé de la question ?

l. Comment les cellules de levure se comportent-elles sur le milieu de croissance ?

m. Dessinez une boîte représentative d'un résultat désigné par un + dans le tableau.

n. Faites de même pour un − .

o. Que signifient exactement ici les signes + et − ? La complémentation ou la recombinaison est-elle impliquée ?

p. Les mutants *mit*⁻ ont-ils tous un comportement différent ?

BCU IRSI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

q. Toutes les petites montrent-elles un comportement différent en combinaison avec les mutants *mit*⁻ ?

r. Comment expliqueriez-vous que certains mutants *mit*⁻ présentent le même comportement alors même que les petites auraient des profils de restriction différents ?

23. Chez la levure une souche haploïde *ant*^{R} (résistant à un antibiotique) survient spontanément. On la combine à une souche *ant*^{S} de type conjuguant opposé pour former un diploïde que l'on laisse sporuler. On isole trois tétrades :

Tétrade 1	Tétrade 2	Tétrade 3
α *ant*^{R}	α *ant*^{R}	*a ant*^{S}
α *ant*^{R}	*a ant*^{R}	*a ant*^{S}
a ant^R	*a ant*^{R}	α *ant*^{S}
a ant^R	α *ant*^{R}	α *ant*^{S}

a. Interprétez ces résultats.

b. Expliquez l'origine de chaque asque.

c. Si vous utilisiez une grande *ant*^{R} pour produire des petites, vous attendriez-vous à ce que certaines des petites soient *ant*^{S} ? Justifiez votre réponse.

24. Nous obtenons deux souches haploïdes de levure toutes deux déficientes en cytochromes. Appelons les *cyt1* et *cyt2*. Nous effectuons les croisements suivants :

$$cyt1^- \times cyt1^+$$

$$cyt2^- \times cyt2^+$$

De chaque croisement, nous isolons une tétrade :

cyt1⁻ *cyt2*⁻
cyt1⁻ *cyt2*⁻
cyt1⁺ *cyt2*⁻
cyt1⁺ *cyt2*⁻

a. Expliquez en quoi ces deux mutants sont différents.

b. A quels autres types d'asques vous attendriez-vous dans chacun de ces croisements ?

c. Comment les deux gènes affectés chez ces mutants pourraient-ils interagir au niveau fonctionnel ?

25. Au cours d'une analyse de rétention de marqueurs chez la levure, on utilise une souche à résistances multiples (*apt*^{R}, *bar*^{R}, *cob*^{R}) pour induire 500 petites. Pour différentes paires de marqueurs, on trouve dans le tableau 20-4 le nombre de petites n'ayant perdu qu'un seul des deux marqueurs. (Par exemple, 87 petites sont *apt*^{S} *bar*^{R} et 120 *apt*^{R} *bar*^{S}). Sur la base de ces résultats, dressez une carte schématique de ces gènes mitochondriaux.

Paire de gènes	Petites chez lesquelles le premier marqueur est perdu	Petites chez lesquelles le deuxième marqueur est perdu
apt bar	87	120
apt cob	27	18
bar cob	48	69

26. A partir d'une culture de levure au génotype grande *cap*^{R} *ery*^{R} *oli*^{R} *par*^{R}, on induit des petites par traitement au bromure d'éthidium. On examine ces petites pour (1) leur résistance aux antibiotiques et (2) la capacité de leur ADNmt de s'hybrider avec

Tableau 22-3

Culture de petite	Résistance (R) ou sensibilité (S)				Capacité (+ ou -) de l'ADNm de petite d'hybrider avec l'ARNmt						
	cap	ery	oli	par	$ARNr_{long}$	$ARNr_{court}$	$ARNt_1$	$ARNt_2$	$ARNt_3$	$ARNt_4$	$ARNt_5$
1	R	S	S	S	+	–	–	–	–	–	–
2	S	S	S	S	–	–	–	–	–	+	–
3	S	S	S	S	–	–	–	+	–	–	+
4	S	S	R	S	–	–	+	–	–	–	–
5	S	R	S	S	+	+	–	–	–	–	–
6	R	S	S	S	–	–	–	–	+	–	–
7	S	S	R	R	–	–	–	+	–	–	–
8	S	S	S	S	–	+	–	–	–	+	+
9	S	R	S	S	+	–	–	–	–	–	–
10	S	S	S	S	–	–	+	–	+	–	–
11	R	S	R	R	–	+	+	+	+	+	+
12	S	R	S	S	+	+	–	–	–	–	–

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

divers types d'ARNmt. En tout, 12 petites sont examinées et le tableau 20-5 résume les résultats de ces analyses. Sur la base de cette information, dressez une carte de l'ADNmt en indiquant l'ordre des 11 loci impliqués dans ces phénotypes. Formulez clairement vos hypothèses et dressez une carte complète.

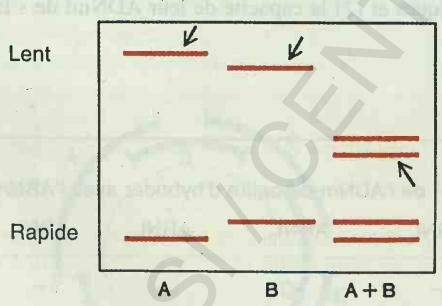
27. Nous comparons les ADNmt de deux souches haploïdes de levure de boulangerie. La souche 1 (type conjuguant α) est originaire d'Amérique du Nord et la souche 2 (type *a*) d'Europe. On digère l'ADN par un enzyme de restriction déterminé et on sépare les fragments par électrophorèse sur un gel. L'échantillon de la souche 1 produit deux bandes, respectivement représentatives d'un très grand et d'un très petit fragment. La souche 2 produit aussi deux bandes, toutes deux de taille intermédiaire. Si vous analysez les bourgeons produits par des diploïdes entre ces deux souches et les tétrades que vous pouvez en obtenir, à quels résultats vous attendez-vous ? En d'autres termes, quels profils de restriction pensez-vous obtenir ?

28. Certaines souches de levure possèdent dans leur cytoplasme des molécules d'ADN circulaire de 2 micromètres (μm) de diamètre. Chez certaines de ces souches cet ADN 2-μm possède un seul site de restriction par Eco RI ; chez d'autres, il y en a deux. On croise une souche à un site avec une souche à deux sites. Tous les bourgeons diploïdes qui en résultent se retrouvent porteurs des deux types d'ADN 2-μm.

a. L'ADN 2-μm est-il transmis de la même manière que l'ADNmt ?

b. Que pensez-vous que puisse être la fonction de l'ADN 2-μm ?

29. Un ADN mitochondrial circulaire est digéré par deux enzymes de restriction A et B. Les résultats sont les suivants :



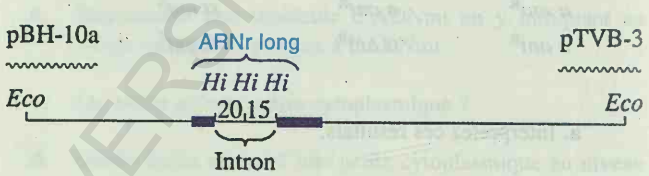
(Les flèches indiquent les bandes qui s'hybrident par la technique de Southern avec une sonde radioactive d'ADNc obtenue à partir d'ARNr de mitochondrie). Dressez une carte schématique des positions des sites de restriction reconnus par les enzymes A et B, et indiquez l'emplacement approximatif du gène ARNr de la mitochondrie.

30. Vous vous intéressez au génome mitochondrial d'une espèce de champignon dont l'analyse génétique est difficile mais dont on peut extraire aisément l'ADNmt. Comment vous y prendriez-vous pour déterminer les positions des principaux gènes mitochondriaux de cette espèce ? (Ne perdez pas de vue que la structure de ces gènes reste plus ou moins conservée au cours de l'évolution).

31. De rares souches d'un certain champignon présentent le phénomène de sénescence.

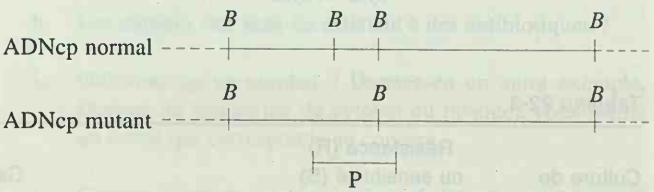
a. Lorsqu'on croise ces souches en tant que mâles avec des partenaires non sénescents on n'obtient aucun descendant sénescent. Cependant lorsqu'on les utilise comme femelles, la sénescence apparaît chez certains des descendants ; certains d'entre eux meurent plus tôt que d'autres et soit plus tôt soit plus tard que la souche parente. Expliquez ces observations.

b. Lorsqu'on coupe l'ADNmt de cultures sénescentes par Eco RI, on remarque l'absence du grand fragment 1 présent chez les souches normales. On trouve à sa place quatre nouveaux fragments Eco-B, C, E et G — totalisant 10 kb de plus que le fragment 1. Ci-dessous une carte du fragment 1 normal ; *Eco* désigne les sites *EcoRI,* et *Hi* les sites *HindIII* ; deux fragments clonés pour servir de sondes sont représentés également.

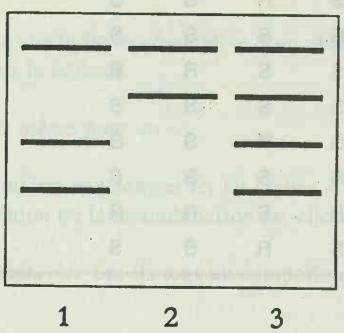


La sonde pBH-10 a se lie à B mais pas à C et la sonde pTVB-3 se lie à C mais pas à B ; aucune des deux sondes ne se lie à E ni à G. Une préparation digérée par *HindIII* montre l'absence du fragment 20 et fait apparaître deux nouveaux fragments de grande taille, K1 et K2. K1 s'hybride à C, E et G et K2 à B et E. Le fragment C1 s'hybride aussi au fragment *HindIII* 15. Que pouvez-vous déduire de ces résultats ?

32. a. Tôt dans le développement d'une plante une mutation de l'ADNcp fait disparaître un site *BgIII* (B) d'après le schéma suivant :



Chez cette espèce l'ADNcp est transmis maternellement. On fait germer des graines de cette plante et on examine l'ADNcp dans la population obtenue. Les ADNcp sont coupés par *BgIII* et hybridés suivant la technique de Southern avec la sonde P. Les autoradiogrammes sont de trois types :



Expliquez l'existence de ces trois types de graines.

b. Chez *Gryllus* (un grillon) et *Drosophila*, on trouve de rares femelles qui contiennent un mélange de deux ADNmt qui diffèrent par la présence ou l'absence d'un seul site de restriction bien défini. Dans la descendance de ces femelles, tous les individus se montrent également pourvus des deux types d'ADNmt. Contrastez ces observations avec celles développées en (a) et avec d'autres résultats discutés dans ce chapitre.

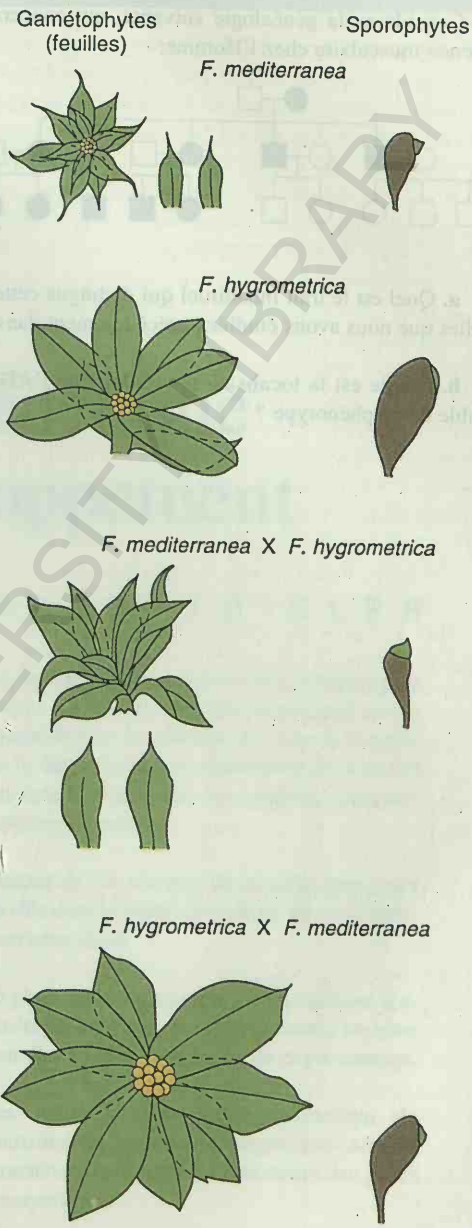
33. Le génome mitochondrial du navet est une grande molécule circulaire, de 218 kb de périmètre et contenant une paire de séquences de 2 kb répétées dans la même orientation et séparées par 83 kb. Cependant, lorsqu'on examine l'ADNmt du navet en détail on en discerne trois types moléculaires : le cercle de 218 kb qui vient d'être décrit, un cercle de 135 kb porteur d'une seule des deux séquences répétées de 2 kb, et un cercle de 83 kb ne portant, lui aussi, qu'une seule de ces deux séquences. Présentez un modèle pour expliquer la présence des deux types moléculaires de taille plus réduite.

34. Des croisements réciproques et des autofécondations ont été pratiqués sur deux espèces de mousse, *Funaria mediterranea* et *Funaria hygrometrica*. L'aspect des sporophytes et des feuilles des gamétophytes est représenté sur le schéma ci-contre. Les croisements mentionnent les partenaires femelles en premier lieu.

a. Décrivez les résultats et résumez en les aspects principaux.

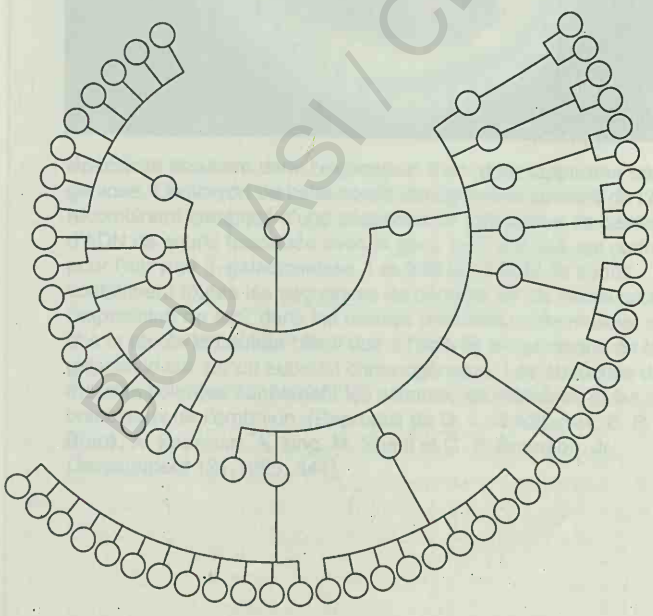
b. Proposez en une explication.

c. Indiquez comment vous mettriez cette explication à l'épreuve ; prenez soin de montrer comment votre explication peut être distinguée expérimentalement d'autres hypothèses éventuelles.



Diagrammes d'après C.H. Waddington, *An Introduction to modern Genetics*, Macmillan, 1939

35. La généalogie ci-dessous dénote un mode de transmission très inhabituel mais qui a été observé. Tous les descendants sont représentés mais les pères de chaque union ont été omis de manière à souligner le caractère remarquable de cette généalogie.

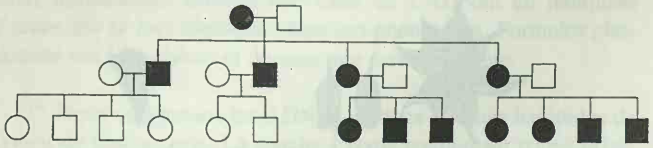


a. Dites en quoi cette généalogie est anormale.

b. Le mode de transmission peut-il être expliqué par
(i) le hasard (si oui, avec quelle probabilité ?)
(ii) des facteurs cytoplasmiques ?
(iii) une hérédité mendélienne ?
Donnez vos raisons.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

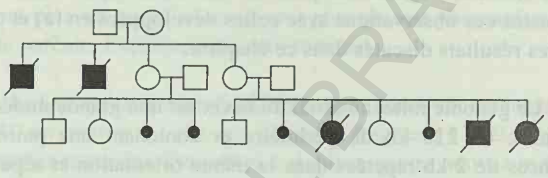
36. Considérez la généalogie suivante, qui concerne une rare déficience musculaire chez l'Homme:



a. Quel est le trait inhabituel qui distingue cette généalogie de celles que nous avons étudiées précèdemment dans ce livre ?

b. Quelle est la localisation cellulaire de l'ADN muté responsable de ce phénotype ?

37. La généalogie suivante indique la récurrence d'une affection neurologique rare (grands symboles noirs) et d'avortements spontanés du foetus (petits symboles noirs) dans une famille (un trait signifie décès).
Expliquez cette généalogie en terme de ségrégation cytoplasmique de mitochondries déficientes.



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

23

La Régulation Génétique au cours du Développement

Spécificité tissulaire dans l'expression d'un gène rapporteur transgénique. L'embryon de cette souris transgénique contient de l'ADN recombinant composé d'une séquence de 258 paires de bases d'ADN de souris fusionnée avec le gène *lacZ* d'*E.coli*, qui code pour l'enzyme β–galactosidase. Les 258 pb d'ADN de souris contiennent toutes les séquences de contrôle en cis nécessaires à l'expression de *lacZ* dans les cellules précurseurs de muscle, ainsi que le révèle la couleur bleue due à l'activité enzymatique de la β-galactosidase sur un substrat chromogénique. Les ébauches de muscles colorées concernent les somites, les membres et les arcs branchiaux de l'embryon. (Reproduit de D. J. Goldhamer, B. P. Brunk, A. Faerman, A. king, M. Shani et C. P. Emerson, Jr. *Development* 121,1995, 644).

CONCEPTS-CLÉS

- La régulation de la synthèse des protéines peut opérer à plusieurs niveaux, impliquant soit la modulation de la structure du gène, le contrôle de la transcription, la maturation du transcrit naissant en ARNm ou des modifications post-transcriptionnelles.
- Chacun de ces niveaux de contrôle peut jouer un rôle dans la production de protéines propres à certains tissus.
- Le phénomène de transmission héréditaire épigénétique implique que l'expression d'un gène peut-être régulée en fonction de sa provenance.
- Des techniques modernes permettent de construire des animaux transgéniques afin de caractériser les éléments régulateurs des gènes eucaryotiques.
- Un défaut de régulation dans l'expression d'un gène peut produire un phénotype dominant.
- Les étapes du développement mettent en jeu une succession de régulations de l'expression génétique.

SYDENHAM UNIVERSITY LIBRARY

En quoi 150 livres d'*E. coli* diffèrent-elles d'une personne du même poids ? La différence majeure est que chacune des cellules d'*E. coli* est autonome (elle doit accomplir toutes les fonctions nécessaires à la vie) alors que l'intégrité d'un organisme pluricellulaire repose sur une coopération entre types cellulaires soumis à une division du travail. Cellules et organes sont fonctionnellement spécialisés. A l'extrême certaines cellules produisent essentiellement un type de protéine. Chez l'Homme par exemple, les cellules B des ilôts du pancréas synthétisent et sécrètent l'insuline, les globules rouges produisent de l'hémoglobine et les lymphocytes B des anticorps. Il est cependant plus fréquent qu'un type cellulaire soit caractérisé par toute une constellation de protéines. La plupart de celles-ci sont exprimées dans la plupart des types cellulaires et ce sont les proportions relatives et la variété des protéines qui différencient les classes de cellules entre elles.

Comme nous l'avons déjà mentionné dans des chapitres antérieurs, le génome des organismes supérieurs contient davantage d'ADN que celui des unicellulaires. Il y a deux raisons à celà, toutes deux en relation avec la nature multitissulaire des organismes supérieurs. En premier lieu les gènes de ces derniers sont plus longs du fait qu'ils contiennent beaucoup plus d'éléments cis-régulateurs (les équivalents des opérateurs bactériens) pour contrôler le déclenchement de la synthèse des protéines correspondantes, leur localisation et leur quantité. En deuxième lieu, les gènes sont bien plus nombreux chez les organismes supérieurs. Alors que la bactérie *E. coli* en contient environ 5.000, la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* en possèdent près de 20.000 et l'Homme 100.000 ou davantage. Comme la plupart des gènes codent pour des protéines, les organismes supérieurs contiennent aussi plus de protéines que les organismes unicellulaires. Certaines des protéines supplémentaires trouvées chez les organismes supérieurs contribuent en tant qu'éléments structuraux à l'organisation plus complexe de leurs cellules et tissus. Nous verrons cependant que nombre d'entre elles sont des protéines régulatrices, par exemple des facteurs de transcription qui règlent les profils d'expression complexes de quantités d'autres protéines. Nous examinerons ici quelques-unes des multiples manières dont ces protéines régulatrices contribuent à établir les différences qui distinguent les types cellulaires rencontrés chez les organismes supérieurs.

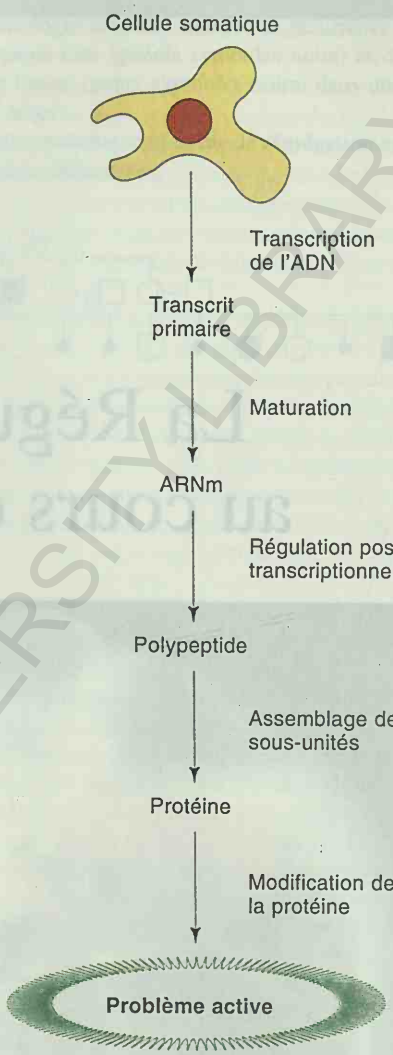


Figure 23-1. Régulation de l'activité des protéines. Dans les cellules plusieurs étapes mènent du gène à la protéine active correspondante. Au cours du développement, des mécanismes de régulation peuvent affecter l'expression de la protéine à chacun de ces niveaux.

Régulation de la synthèse des protéines

Comment la synthèse des protéines est-elle contrôlée, aussi bien qualitativement que quantitativement ? D'un gène à l'autre nous trouvons des exemples de régulation opérant à chacune des étapes qui mènent du gène à la protéine fonctionnelle (figure 23-1). La structure et le nombre de copies du gène constituent un premier niveau de contrôle. Ensuite la transcription elle-même peut être régulée. Plus loin encore, la maturation du transcrit naissant peut être menée de manières différentes dans différents tissus. Enfin la capacité d'un transcrit à être traduit peut faire l'objet de modulation. A chacun de ces niveaux, il a été démontré que la régulation peut jouer un rôle important dans l'élaboration de cellules et tissus différents au cours du développement. Tout comme le déchiffrement du code génétique a conduit à comprendre comment l'information génétique détermine la structure des protéines, le déchiffrement du code de régulation de l'expression génétique sera crucial pour comprendre comment les cellules en viennent à assumer différents rôles dans le développement et la physiologie d'un organisme.

Régulation de la spécificité tissulaire au niveau de la structure de l'ADN

Pendant de nombreuses années, on a crû que les structures des ADN de cellules somatiques et germinales étaient identiques. Ceci reste vrai pour la plus grande partie de l'ADN cellulaire. Cependant quelques exceptions importantes ont été mises en évi-

dence dans certaines cellules somatiques d'organismes supérieurs. Comme ces cellules sont exclusivement somatiques, les mécanismes de régulation qui y altèrent la structure de l'ADN ont pu se développer sans conséquences pour l'organisation des gènes dans la lignée germinale.

Nous examinerons ici un exemple de réarrangement génétique aux conséquences importantes sur le plan de la régulation. C'est un cas où l'amplification du nombre de copies d'un gène mène à un haut niveau d'expression dans un tissu particulier. Plus loin dans ce chapitre, nous verrons comment des réarrangements d'ADN somatique jouent un rôle crucial dans une voie très spécialisée du développement, celle qui mène à la production d'anticorps par les cellules du système immunitaire.

La production des oeufs, ou ovogénèse se déroule chez *Drosophila* dans les ovaires de la femelle adulte. Durant ce processus l'ovocyte atteint sa maturité et une enveloppe cellulaire protéique est synthétisée. Les cellules folliculaires (cellules somatiques entourant l'ovocyte) doivent construire cette enveloppe (ou chorion) très rapidement ce qui signifie synthétiser dans de brefs délais des quantités élevées des protéines du chorion. La drosophile a élaboré une solution élégante à ce problème : le nombre de copies des gènes correspondants est accrû par des réarrangements de l'ADN somatique circonscrits aux cellules folliculaires. Chez cet insecte il n'y a que sept gènes majeurs pour les protéines du chorion. Durant le développement des cellules folliculaires un mécanisme de réplication particulier (figure 23-2) amplifie ces gènes de 20 à 80 fois juste avant qu'ils ne doivent être transcrits. Donc, chez *Drosophila*, des copies de gènes d'enveloppe supplémentaires ne deviennent disponibles que là et au moment où elles sont requises. Il est bien plus efficace de procéder ainsi plutôt que d'avoir à traîner de multiples copies de gènes du chorion dans chaque cellule de l'organisme.

Message Des modifications somatiques affectant la structure ou le nombre de copies de certains gènes peuvent rendre compte de spécificités tissulaires dans la production de protéines.

Régulation de la transcription des gènes

Le mode le plus fréquent de régulation de l'expression génétique opère sur la transcription elle-même. C'est un processus économe en énergie puisqu'il épargne à la cellule de transcrire les gènes dont les protéines ne sont pas requises. La plupart des gènes sont contrôlés par des mécanismes qui modulent en temps et en lieu la quantité de transcrits à produire dans une cellule déterminée. Ces mécanismes mettent en jeu différentes séquences d'ADN auxquelles peuvent se lier des protéines qui activent ou répriment la transcription. Rappelez-vous qu'au chapitre 18 nous avons déjà parlé des promoteurs, amplificateurs et silenceurs, ces séquences d'ADN qui jouent un rôle dans la transcription. Les **promoteurs** sont les sites de liaison de l'ARN polymérase, là ou la transcription commence. Les **amplificateurs** sont les sites de liaison de facteurs de transcription qui interagissent avec l'ARN polymérase de manière à l'induire à démarrer la transcription. Les **silenceurs** forment avec des facteurs de transcription des complexes qui, directement ou indirectement bloquent le démarrage de la transcription par l'ARN polymérase.

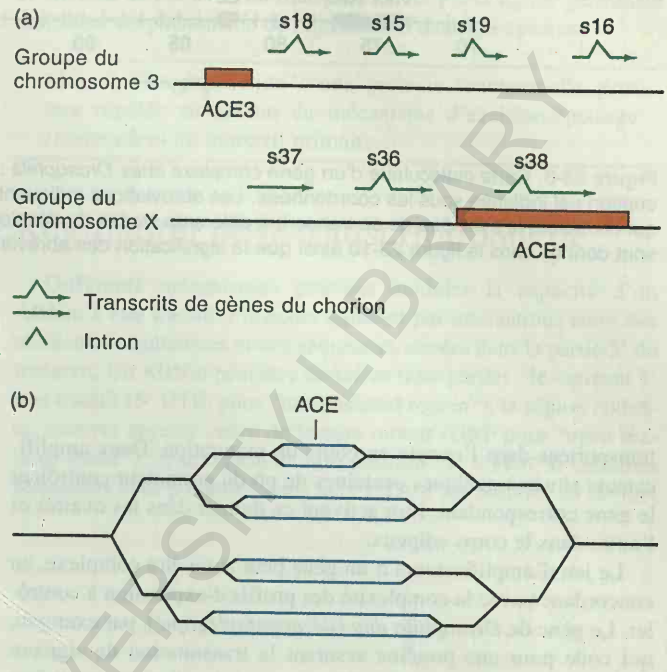


Figure 23-2. Structure des deux groupes de gènes impliqués dans la formation de l'enveloppe de l'oeuf chez *Drosophila melanogaster* (a) le groupe du chromosome 3 contient quatre gènes et celui du chromosome X trois. Chaque groupe est long d'environ 10kb. Chaque région ACE contient un élément qui contrôle l'amplification du nombre de copies de ces gènes. Il s'agit d'un site auquel est enclenché un mécanisme de réplication de l'ADN spécifique des cellules folliculaires de l'ovaire. (b) Un modèle montrant comment l'amplification pourrait se produire par des réplications multiples amorcées dans une région ACE. Chaque ligne représente un ADN bicaténaire. (Adapté de T. Orr-Weaver, *Bio Essays* 13,1991,97).

Régulation de transcription spécifique de tissus

De nombreux amplificateurs d'eucaryotes supérieurs activent la transcription en fonction du tissu : ils induisent l'expression d'un gène dans un ou quelques types cellulaires. Cette spécificité tissulaire opère de deux façons. Comme déjà mentionné au chapitre 18, les amplificateurs ne sont que des sites de liaison pour des facteurs de transcription qui interagissent avec l'ARN polymérase au promoteur. Un amplificateur peut agir en fonction du tissu si le facteur de transcription correspondant n'est présent que dans certains types de cellules ou si d'autres protéines se lient à des sites proches de l'amplificateur, le rendant inaccessible au facteur de transcription.

Propriétés des amplificateurs spécifiques de tissus

Chez certains gènes, la régulation peut être assurée par des jeux d'amplificateurs simples. Chez la drosophile, par exemple, les vitellogénines sont de grosses protéines vitellines synthétisées dans l'ovaire de la femelle adulte et dans le corps adipeux (un organe qui constitue essentiellement le foie de la mouche) puis

PCU JASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

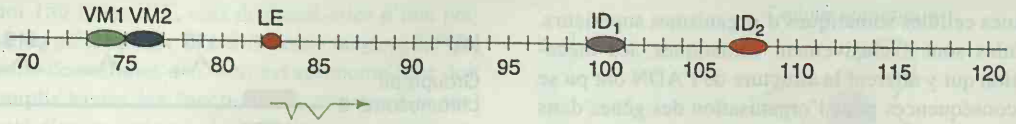


Figure 23-3. Carte moléculaire d'un gène complexe chez *Drosophila* : le gène *dpp*. Les unités sont en kilobases. L'unité de base de la transcription est indiquée sous les coordonnées. Les abréviations indiquent les sites de certains des nombreux amplificateurs à spécificité tissulaire qui contrôlent la synthèse de ce transcrit à différents stades du développement. Les profils d'expression tissulaire propres à ces amplificateurs sont donnés dans la figure 23-10 ainsi que la signification des abréviations.

transportées dans l'oocyte en cours de maturation. Deux amplificateurs situés à quelques centaines de pb du promoteur contrôlent le gène correspondant, l'un activant ce dernier dans les ovaires et l'autre dans le corps adipeux.

Le jeu d'amplificateurs d'un gène peut aussi être complexe, en concordance avec la complexité des profils d'expression à contrôler. Le gène de *Drosophila dpp* (*décapentaplégique*), par exemple, qui code pour une protéine assurant la transmission de signaux intercellulaires (voir chapitre 24), contient des dizaines, peut-être des centaines d'amplificateurs disposés tout au long d'un segment d'ADN de 50 kb. Certains sont en amont du promoteur, d'autres dans les introns, d'autres encore en aval du site de polyadénylation. Chacun de ces amplificateurs contrôlent l'expression de *dpp* en un emplacement différent de l'animal (figure 23-3).

Chez les procaryotes, les éléments cis-régulateurs, tels que les opérateurs, résident habituellement dans la proximité immédiate du promoteur. Chez les eucaryotes, par contre les amplificateurs de spécificité tissulaire peuvent, comme nous venons de le voir, être situés assez loin du promoteur, à plus de 30 kb. Comment une protéine liée à l'ADN aussi loin du promoteur peut-elle interagir avec lui ? Dans les conditions appropriées (par exemple quand certaines séquences d'ADN sont présentes ou bien sous l'influence de certaines protéines liées à l'ADN), l'ADN peut se replier en boucle de manière à ce que des séquences très éloignées l'une de l'autre sur l'ADN linéaire soient amenées en proximité immédiate dans la réalité tri-dimensionnelle du noyau.

La nécessité d'amplificateurs multiples pour réguler les gènes en fonction des tissus explique en partie la grande taille des gènes chez les eucaryotes supérieurs. Cette régulation peut être fort complexe, requérant l'entrée en jeu de nombreux amplificateurs parfois très distants.

Message Les amplificateurs eucaryotiques peuvent agir à des distances considérables ; ils permettent une véritable télécommande de la transcription.

Maturation des transcrits et régulation spécifique de tissu

Les transcrits de la plupart des gènes d'eucaryotes supérieurs subissent une maturation avant de devenir des ARNm. Ce processus d'excission-épissage peut-être un point de contrôle important au cours du développement. La régulation de l'**élément transposable P** (figure 23-4) en est un exemple frappant. Rappelons-nous (chapitre 21) que les éléments P constituent une famille de séquences d'ADN retrouvées chez de nombreuses souches de *Drosophila melanogaster*.

L'élément P intact est un segment d'ADN long de 3 kb qui code pour sa propre transposase, une enzyme qui catalyse la transposition de l'élément d'un site du génome en un autre. Chez les mouches pourvues de P, il ne se transpose que dans la lignée germinale, non dans les cellules somatiques. Ceci s'explique par le fait que la transposase n'est synthétisée que dans la lignée germinale. La transcription de P opère cependant chez toutes les cel-

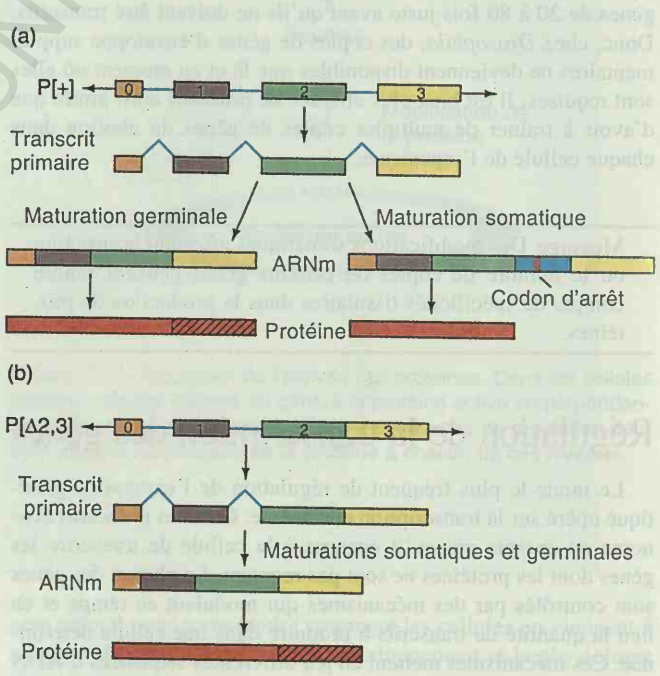


Figure 23-4. Expression des éléments P de *Drosophila* dans la lignée germinale : un exemple de spécificité tissulaire par régulation de la maturation d'un ARN. (a) La figure montre les structures des ARNm d'un élément P propres aux tissus somatiques et germinaux. L'ARNm germinal est formé par excision de quatre exons (numérotés de 0 à 3) et code pour la transposase de P. L'ARNm somatique ne subit pas l'excision de l'intron qui sépare les exons 2 et 3. Comme cet intron contient un codon d'arrêt la protéine produite est défective et ne possède pas d'activité de transposase. (b) Un élément P transgénique modifié, P {Δ 2,3}, sans l'intron qui sépare les exons 2 et 3. Cet élément produit dans tous les tissus un ARNm identique à celui de l'élément P sauvage et peut donc produire une transposase active dans le germen et le soma.

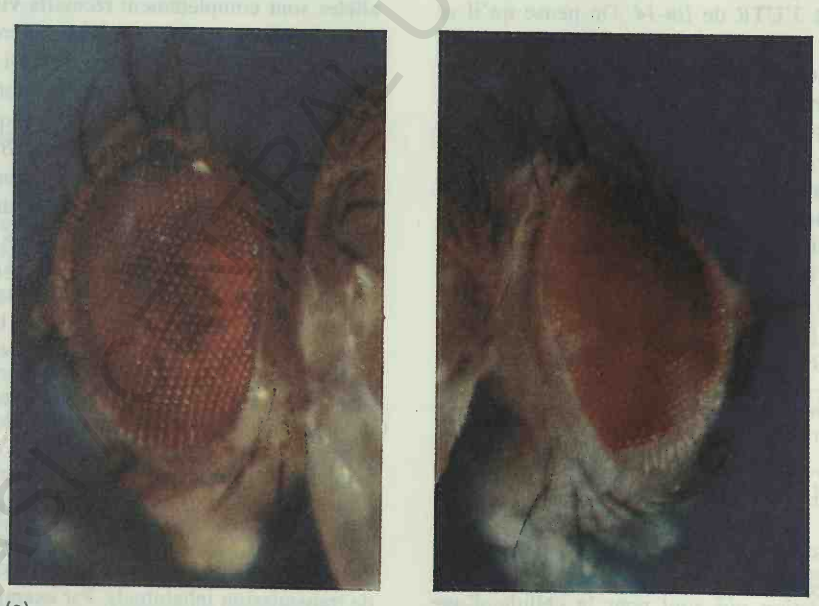
BCU SCIENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

lules. C'est en fait l'épissage de l'ARNm de la transposase de P qui diffère dans le germen et dans le soma. L'ARNm de la transposase de la lignée germinale contient quatre exons (0, 1, 2 et 3, figure 23-4). Frank Laski, Don Rio et Gerry Rubin firent l'hypothèse que dans les cellules somatiques l'ARNm conserve l'intron situé entre les exons 2 et 3 ; en d'autres termes dans les cellules somatiques cet intron n'est pas excisé. Comme l'intron contient un codon d'arrêt la transposase produite est défective n'étant codée que par les exons 0, 1 et 2 et dépourvue de sa partie carboxyterminale. Afin de mettre cette hypothèse à l'épreuve, Laski, Rio et Rubin construisirent un élément P dans lequel l'intron en question avait été délété in vitro et l'élément ainsi manipulé, P {Δ2,3} fut introduit dans les mouches par transformation. La production de clones tissulaires mutants chez des mouches portant un P {Δ2,3} en même temps qu'un autre élément P défectif et contenant un marqueur exprimé dans un tissu somatique (l'oeil), montra que l'élément manipulé pouvait induire la transposition somatique d'un autre élément P (figure 23-5). Ceci confirmait l'idée que la restriction de l'activité de transposition de P à la lignée germinale était bien un phénomène de régulation d'excision-épissage.

Message La production d'une protéine fonctionnelle peut être régulée au niveau du mécanisme d'excision-épissage (maturation) du transcrit primaire.

Régulation post-transcriptionnelle

Différents mécanismes peuvent moduler la capacité d'un ARNm à être traduit. Plusieurs agissent par interactions entre des molécules régulatrices et des séquences situées dans la partie 3' du transcrit. Un ARNm peut être divisé en trois parties : le segment 5' non traduit (5' UTR, pour "untranslated region"), la région codante, souvent appelée cadre de lecture ouvert (ORF pour "open reading frame"), et la région 3' non traduite (3' UTR). Si certaines séquences sont présentes dans la 3'UTR d'un ARNm, ce dernier



(a) (b)

Figure 23-5. Expression somatique de la transposase P chez *Drosophila*. Dans les deux cas (voir a et b) les mouches contiennent une source de transposase P et un deuxième élément P dépourvu de transposase mais encore susceptible d'être transposé par une transposase P issue du premier élément. Le deuxième élément P est marqué par le gène w^+ qui donne des yeux rouges. Les allèles white présents dans les mouches utilisées sont des mutations *w* nulles de sorte que toute pigmentation eventuelle de l'oeil dépend de la présence du transposon P [w^+]. (a) La transposase P provient d'un élément P sauvage (voir figure 23-4a). L'oeil est uniformément rouge. L'absence de tissu oculaire blanc indique que l'élément P est inactif dans le soma. L'ARNm de la transposase de type sauvage a donc été maturé de manière à produire la forme inactive de l'enzyme. (b) Ici la transposase provient du transgène P {Δ2,3}. Les yeux sont un mélange de secteurs rouges et blancs. Les secteurs blancs sont composés de tissus où l'élément P (w^+) a quitté son site original d'insertion dans le chromosome, ce qui indique la présence d'une transposase active dans ces cellules somatiques. (Aimablement fourni par G. Misra et G. Rubin, Université de Californie.

sera rapidement dégradé. Dans d'autres cas, des séquences en 3'UTR ne provoquent pas la dégradation mais abaissent considérablement le taux de traduction. De telles séquences sont présentes dans les 3'UTR d'ARNm de gènes impliqués dans la détermination du sexe chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Des mutations qui modifient ces séquences conduisent à des taux de synthèse anormalement élevés des protéines codées par les gènes en question. Ces séquences 3'UTR sont vraisemblablement les sites de liaison de protéines qui dégradent les ARNm ou bloquent leur traduction.

Un nouveau phénomène, dans lequel des séquences 3'UTR interagissent avec une molécule régulatrice d'ARN a été mis en évidence récemment chez *C. elegans* au cours de l'analyse de mutations **hétérochroniques**, c'est-à-dire qui altèrent le programme temporel de développement. Chez ce ver nématode, l'adulte se développe après quatre stades larvaires. Certaines mutations hétérochroniques amènent le ver à se développer prématurément, après trois stades larvaires seulement. D'autres postposent le développement de l'adulte, ajoutant un cinquième stade à la série normale. L'explication de ces altérations temporelles se trouve dans la chronologie des divisions cellulaires devant se succéder dans les diverses lignées cellulaires ; lorsqu'on passe outre à certaines divisions, un adulte se forme prématurément ; lorsqu'elles sont réitérées, l'arrivée au stade adulte est retardée. Deux des gènes encourant des mutations hétérochroniques sont *lin-4* et *lin-14* (*lin* est l'abbréviation de "lineage" ou lignée). Le produit de *lin-4* réprime la traduction de l'ARNm *lin-14*. Il se fait que le répresseur codé par *lin-4* n'est pas une protéine mais un ARN qui possède des séquences complémentaires à celles du segment 3'UTR de *lin-14*. On pense qu'il se forme un duplex d'ARN entre ces deux séquences avec pour conséquence une répression de la traduction. Un 3'UTR peut aussi contenir des séquences agissant comme sites d'ancrage d'ARNm à certaines structures cellulaires. La possibilité de localiser un ARNm particulier au sein d'une cellule peut être à l'origine de différences de concentrations de la protéine correspondante dans la cellule même et dans sa descendance. Au chapitre 25, nous verrons comment ce mécanisme de localisation contribue à établir l'un des axes du corps dans l'embryon de *Drosophila*.

Message Les régions non codantes des ARNm peuvent également exercer des fonctions de régulation.

Régulation post-traductionnelle

Une fois les polypeptides synthétisés, la formation des protéines fonctionnelles correspondantes peut encore être soumise à des phénomènes de régulation qui sont pour la cellule d'une importance capitale. Des modifications enzymatiques peuvent modifier l'activité de certaines protéines. Au chapitre 24 nous verrons des exemples où la phosphorylation de certains acides aminés peut avoir ce résultat. Des interactions entre différents polypeptides formant des complexes peuvent influencer les activités des polypeptides constituants. Par exemple, au cours de la discussion de la détermination du sexe chez *Drosophila* vers la fin de ce chapitre, nous verrons que l'activité de facteurs de transcription peut-être contrôlée par des interactions compétitives entre différentes sous-unités susceptibles de former des dimères.

Transmission héréditaire épigénétique

Ce qui précède nous donne une vue générale de la régulation de la synthèse protéique, une vue qui rend compte de la plupart des observations accumulées par les généticiens sur près d'un siècle. Il subsiste cependant des phénomènes encore inexpliqués ; on les regroupe généralement sous l'appellation **transmission héréditaire épigénétique** parce qu'ils semblent mettre en cause des altérations transmissibles sans que l'ADN lui-même ait été modifié. Il est probable que ces phénomènes opèrent à un niveau de contrôle génétique encore très mal défini. Voyons quelques exemples où le degré d'activité d'un gène dépend de ses antécédents généalogiques.

Paramutation

Il s'agit d'un phénomène observé chez les plantes, tout particulièrement chez le maïs (figure 23-6) où quelques cas ont été rapportés. Certains allèles appelés **paramutables** et apparemment normaux subissent des altérations irréversibles après avoir coexisté dans le même génome avec d'autres allèles appelés **paramutagéniques**. Le gène *B-I* du maïs code pour une enzyme de la voie de biosynthèse des pigments anthocyaniques dans divers tissus. D'ordinaire les allèles *b* nuls ne possèdent pas ces pigments et ces allèles sont complètement récessifs vis-à-vis de *B-I*. Il existe un allèle paramutagénique, *B'*, qui confère la capacité de synthétiser ces pigments en petites quantités. Si l'on croise entre eux des homozygotes *B-I* et *B'* les hétérozygotes obtenus sont faiblement pigmentés et ont la même apparence que les homozygotes *B'*. Ce résultat suggère à première vue que *B-I* soit récessif vis-à-vis de *B'*. Si cette explication simple était correcte, l'autofécondation de ces plantes hétérozygotes devrait produire des individus homozygotes *B-I*. En réalité, seuls des allèles *B'* se manifestent dans les générations suivantes indiquant que l'allèle *B-I* a subi une paramutation. D'une manière ou d'une autre, par le simple fait d'avoir été exposé pendant une génération à l'allèle paramutagénique *B'* présent dans le même génotype, l'activité de l'allèle *B-I* a subi une altération permanente.

Empreinte parentale

Un autre exemple de transmission épigénétique, découvert il y a près de 10 ans chez les mammifères est celui des **empreintes parentales** : certains gènes autosomiques manifestent des modes de transmission inhabituels. Par exemple, l'allèle *Igf2* de la souris est exprimé uniquement s'il provient du père. On le dit empreint par la mère puisque la copie dérivée de la mère est inactive. Inversément, le gène de souris *H19* n'est exprimé que s'il est hérité de la mère ; *H19* est donc empreint par le père. La conséquence de l'empreinte parentale est que les gènes qui y sont soumis sont exprimés comme s'ils étaient hémizygotes même s'il en existe deux copies dans chaque cellule. De plus, lorsqu'on examine ces gènes sur le plan moléculaire, aucun changement de séquence n'apparaît. La seule modification observée est la présence de

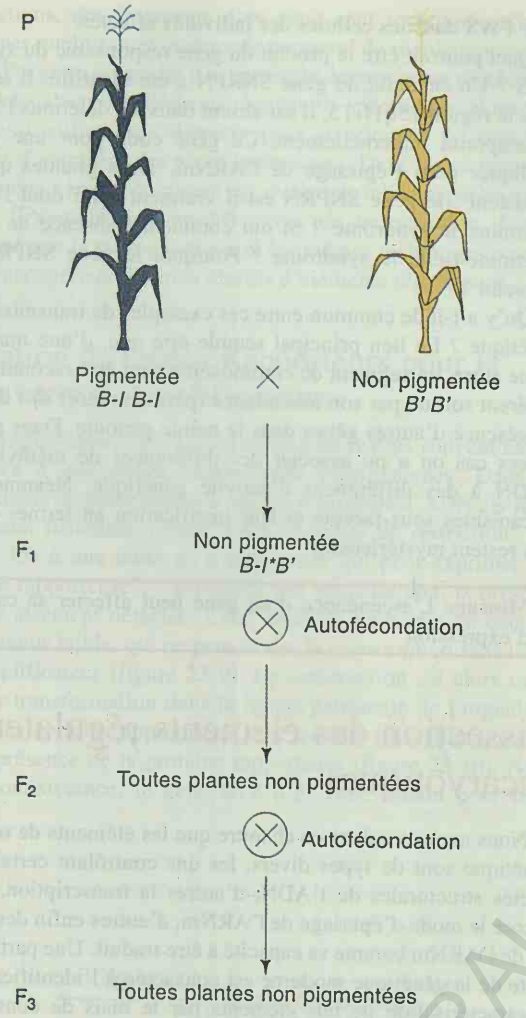


Figure 23-6. Une série de croisements illustrant le phénomène de paramutation. La mutation *B-I* donne des plantes pigmentées alors que la mutation *B'* donne des plantes presque dépourvues de pigmentation. Normalement, lorsque *B-I* est croisé avec des allèles récessifs non pigmentés du gène *b*, les plantes obtenues sont pigmentées. Cependant, lorsque *B-I* et *B'* sont croisées, la F_1 est non pigmentée, comme les homozygotes *B'*. Donc *B-I* est altéré du fait même de se trouver dans le même génome que *B'* ; on désigne cette situation par le symbole *B-I**. Si ce résultat était simplement dû à une dominance de *B'* sur *B-I*, une autofécondation des plantes de la F_1 devraît produire des homozygotes *B-I* pigmentés à raison d'un quart de la descendance F_2. Des croisements entre plantes de la F_2 et de générations ultérieures ne restaurent pas le phénotype pigmenté. On considère donc que *B-I* a subi une paramutation du fait de sa présence simultanée dans le même noyau que l'allèle *B'*.

groupes méthyl ($-CH_3$) supplémentaires sur certaines bases des gènes empreints. Chez les organismes supérieurs on observe ci et là des bases méthylées (à l'exception de *Drosophila*, par exemple). Ces groupes méthyl sont ajoutés à l'ADN par des enzymes, des méthylases. Ils peuvent en être retirés par des déméthylases. En générale, le niveau de méthylation présente une corrélation avec le niveau de transcription : les gènes actifs sont moins méthylés que les gènes inactifs. On ne sait cependant pas si ce sont les variations du degré de méthylation qui provoquent les modifications épigénétiques d'activité du gène ou si au contraire, ce sont les variations du degré de méthylation qui sont dues à de telles modifications

Empreinte et Inactivation du Chromosome X. Par certains aspects le phénomène d'inactivation du chromosome X rappelle l'empreinte parentale. Cette inactivation (rappelez-vous le chapitre 3) est en fait la manière dont les mammifères résolvent le problème posé par la présence de chromosomes X en nombres différents chez les deux sexes. Chez les organismes où l'un des sexes est hémizygote pour l'un des X, un mécanisme appelé compensation de dose égalise l'activité de la plupart des gènes liés à X dans les deux sexes. Chez les mammifères femelles, la compensation de dose est accomplie par l'inactivation de l'un des deux X ; un seul est donc maintenu en activité (figure 23-7). Le seul X présent dans un individu XY reste actif. Chez un mammifère XX, par contre, l'un des deux X est inactivé et condensé en un corpuscule compact, le corpuscule de Barr (figure 3-25). Dans les embryons des mammifères euthériens, l'inactivation de X se produit au hasard dès le début du développement, c'est-à-dire que chez certains individus XX ce sera le chromosome X dérivé de la mère qui sera inactivé dans certaines cellules, et le X dérivé du père dans d'autres cellules (figure 23-7). Le mode de pigmentation en mosaïque de la fourrure des chats "calico" (voir la figure 3-27) est due à un tel processus. Dans d'autres cas, cependant, c'est une empreinte parentale qui détermine celui des chromosomes X qui subira l'inactivation. Chez les mammifères primitifs (prothériens) comme le

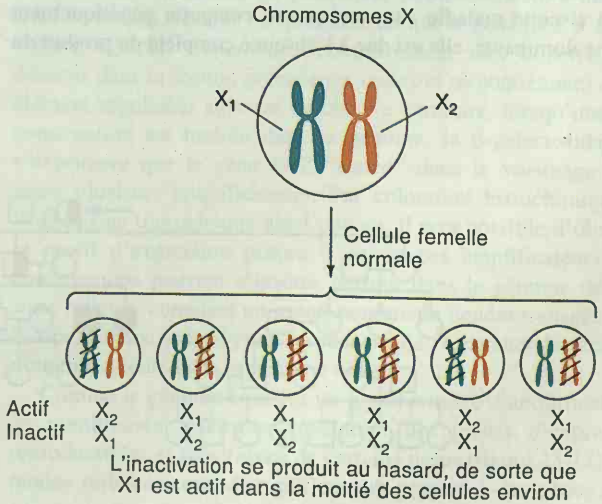


Figure 23-7. Inactivation du chromosomeX chez les mammifères. Cette inactivation se produit au hasard chez les individus normaux. (Modifié de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2ième éd. Copyright© 1992 par Scientific American Books).

B.C.U. „N. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

kangourou c'est toujours le X paternel qui est inactivé. L'inactivation du X paternel se produit aussi dans les tissus extra-embryonnaires d'autres mammifères, euthériens ceux-ci : les tissus qui formeront les membranes des poches remplies de fluide qui entourent le fétus (voyez par exemple la discussion de l'amniocentèse au chapitre 15 et la figure 15-33). Dans ces cas donc, le X paternel doit être reconnu par le zygote comme différent du X maternel.

Empreinte Parentale et Maladies Humaines. L'empreinte parentale est invoquée pour expliquer le comportement génétique apparemment bizarre de certaines maladies humaines. Le syndrome de Prader-Willi (PWS) est une maladie héréditaire qui se manifeste par une taille réduite, l'obésité, des extrémités petites, un faible tonus musculaire, un retard mental et d'autres caractéristiques. Les patients PWS ont une délétion héritée du père et concernant une région bien précise du chromosome 15, formée des trois bandes *15q11-13*). Occasionnellement, on observe des patients PWS avec une autre anomalie du chromosome 15 : les deux chromosomes 15 sont d'origine maternelle. Cette situation anormale est sans doute due à la fécondation d'un ovule avec deux copies du chromosome 15 (produit par non-disjonction durant l'ovogénèse) par un spermatozoïde dépourvu de ce chromosome (suite à une non-disjonction durant la spermatogénèse).

Pourquoi ces deux anomalies différentes donnent-elles des symptômes similaires ? On pense que chez tous les individus il existe sur le chromosome 15 dans les bandes q11 à 13 un gène "empreint par la mère", c'est-à-dire que la copie maternelle (ou les deux copies dans le deuxième type de PWS) est inactivée, soit durant l'ovogénèse ou peu de temps après la fécondation. A cause de cela, pour avoir un phénotype normal, il faut avoir hérité de son père une copie normale du gène concernant le caractère PWS (figure 23-8). Si par contre aucun gène fonctionnel d'origine paternelle n'est transmis (comme c'est le cas dans les deux types d'anomalies décrits) la descendance aura le phénotype PWS. Donc même si cette maladie autosomique se comporte génétiquement comme dominante, elle est due à l'absence complète du produit du gène PWS dans les cellules des individus affectés.

Quel pourrait être le produit du gène responsable du syndrome PWS ? Un candidat, le gène SNRPN a été identifié. Il se trouve dans la région 15q11-13, il est absent dans les délétions PWS et il est empreint maternellement. Ce gène code pour une protéine impliquée dans l'épissage de l'ARNm. Trois grandes questions subsistent : le gène SNPRN est-il vraiment celui dont l'absence détermine le syndrome ? Si oui comment l'absence de ce gène détermine-t-elle le syndrome ? Pourquoi le gène SNPRN est-il empreint ?

Qu'y a-t-il de commun entre ces exemples de transmission épigénétique ? Le lien principal semble être que, d'une manière ou d'une autre, un segment de chromosome peut être reconnu comme différent soit de par son ascendance (père ou mère) soit du fait de la présence d'autres gènes dans le même génome. Dans plusieurs de ces cas on a pu associer des différences de méthylation de l'ADN à des différences d'activité génétique. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents et leur justification en termes d'évolution restent mystérieuses.

Message L'ascendance d'un gène peut affecter sa capacité d'expression

Dissection des éléments régulateurs eucaryotiques

Nous avons vu dans ce chapitre que les éléments de régulation génétique sont de types divers, les uns contrôlant certaines propriétés structurales de l'ADN, d'autres la transcription, d'autres encore le mode d'épissage de l'ARNm, d'autres enfin des propriétés de l'ARNm comme sa capacité à être traduit. Une partie importante de la génétique moderne est consacrée à l'identification et à la caractérisation de tels éléments par le biais de constructions transgéniques, où des molécules d'ADN recombinant sont insérées dans le génome d'un organisme (voir chapitre 15). Dans ces

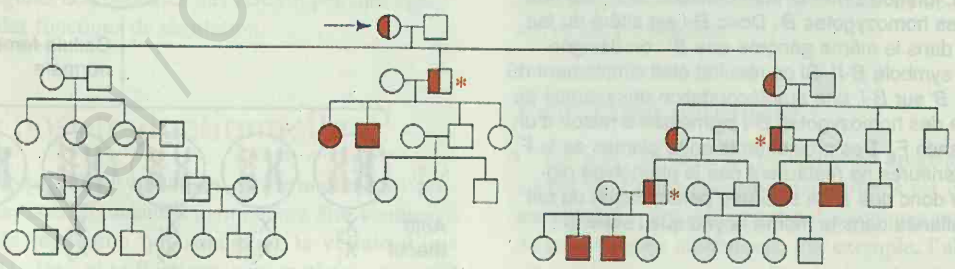


Figure 23-8. Une généalogie du syndrome de Prader-Willi (PWS). Les membres affectés de cette famille hypothétique sont représentés par des carrés et des cercles pleins. Les pères (voir astérisques rouges) de la descendance PWS proviennent tous de la première union représentée dans ce diagramme. Ces pères sont hétérozygotes pour l'allèle mutant PWS et c'est ce gène mutant dépourvu d'activité normale, qu'ils transmettent à la descendance PWS. Leurs descendants non affectés héritent par contre l'allèle normal de ce gène PWS. Pour expliquer la transmission du syndrome dans cette généalogie nous devons supposer que le gène PWS s'est introduit dans la famille via la femme indiquée par la flèche bleue.

constructions, des fragments d'un gène sont incorporés afin de déterminer quel tissu et quel mode temporel de régulation ce gène affecte. Par cette approche il est possible de proche en proche d'en arriver à localiser des éléments régulateurs spécifiques. Nous pouvons aussi utiliser ces derniers pour développer de nouvelles manières d'identifier des gènes intéressants. Dans les sections suivantes, nous verrons comment on réalise de telles expériences en prenant l'exemple des amplificateurs de transcription. Notons cependant que la même logique et les mêmes techniques peuvent servir à caractériser d'autres classes d'éléments régulateurs.

Utilisation de Gènes Rapporteurs pour la Découverte d'Amplificateurs

Les amplificateurs d'un gène cloné sont le plus souvent identifiés grâce à des **gènes rapporteurs** transgéniques. Dans les constructions de gènes rapporteurs des fragments d'ADN cis-régulateurs sont fusionnés (grâce à des enzymes de restriction, voir chapitre 15) à une unité de transcription qui peut exprimer une "protéine rapporteuse", c'est-à-dire une protéine dont la présence peut-être aisément détectée. Cette unité de transcription contient un promoteur faible, qui ne peut initier la transcription sans l'aide d'un amplificateur (figure 23-9). La construction est alors introduite par transformation dans la lignée germinale de l'organisme hôte et les cellules appropriées sont traitées histochimiquement pour la présence de la protéine rapporteuse (figure 23-10). Notre vieille connaissance, le gène *lacZ* d'*E. coli*, codant pour la β-galactosidase dans l'opéron lactose, est un gène rapporteur très populaire. L'expression de la protéine rapporteuse dans un tissu révèle la présence d'un amplificateur au sein du fragment d'ADN testé. Dès qu'un fragment est identifié comme contenant un amplificateur, ce dernier peut être localisé plus finement en testant des fragments de plus en plus petits grâce au même gène rapporteur.

Finalement la séquence de l'amplificateur peut-être déterminée à partir d'un fragment bien circonscrit par les tests précédents. Une fois cette séquence connue, la question suivante est l'identité des facteurs de transcription qui se lient à l'amplificateur. Il existe à présent des méthodes qui permettent d'identifier les protéines qui se lient à des amplificateurs et de cloner les gènes correspondants. Ces derniers sont alors caractérisés par des techniques génétiques et moléculaires. Grâce à ces approches expérimentales, on peut reconstruire en détail les schémas de régulation des gènes eucaryotiques.

Message L'utilisation de gènes rapporteurs permet d'isoler les éléments régulateurs d'autres gènes.

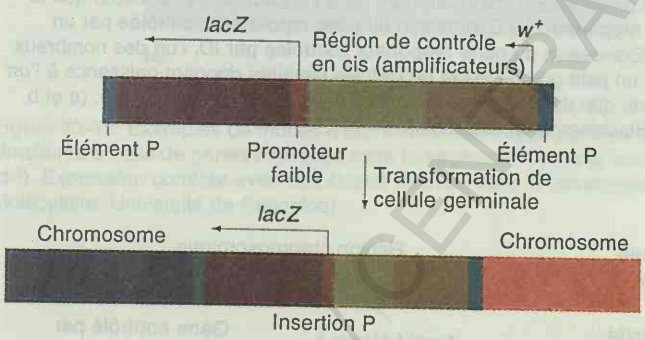


Figure 23-9. Utilisation d'un gène rapporteur chez *Drosophila* pour identifier des amplificateurs. La partie supérieure représente une partie du plasmide délimitée par les extrémités d'un élément transposable de telle manière que la région interstitielle puisse être insérée dans le génome à la suite d'une transformation (voir chapitre 21). Une région d'ADN supposée contenir un ou plusieurs amplificateurs est insérée dans le voisinage immédiat d'un promoteur trop faible pour amorcer de lui-même la transcription. Ce promoteur est joint au gène de structure de la β-galactosidase d'*E.coli* (*lacZ*). Si la construction contient un ou plusieurs amplificateurs ils induiront l'expression de *lacZ* dans un ou des tissus bien spécifiques. Les embryons et les disques imaginaux des figures 23-10a, c et d sont des exemples d'expression à partir de telles constructions utilisant un gène rapporteur.

Capture de Gènes par des Amplificateurs

L'existence même d'éléments régulateurs nous donne les moyens d'identifier des gènes par des approches nouvelles. Considérons l'exemple de chercheurs étudiant le développement d'un organe et désireux d'identifier les gènes qui sont exprimés dans cet organe mais non dans les autres tissus de l'organisme. Dans ce but ils pourront mettre en oeuvre des techniques basées sur le fait que certains éléments régulateurs agissant en cis, tels que les amplificateurs exercent leur effet sur les gènes qui leurs sont adjacents. L'une des plus intéressantes parmi ces techniques est appelée "capture par amplificateurs".

Les éléments de capture par amplificateurs sont des ADN recombinants contenant un promoteur faible connecté à un gène dont on pourra mesurer l'expression, tel que le gène *lacZ* d'*E. coli* (figure 23-11). Cependant, contrairement aux constructions décrites dans la section précédente, celles-ci ne contiennent *aucun* élément régulateur agissant en cis. Au contraire, lorsqu'une telle construction est insérée dans le génome, la β-galactosidase ne s'exprimera que le gène *lacZ* "aterrit" dans le voisinage d'un, voire plusieurs amplificateurs. Par coloration histochimique de l'organisme transgénique ainsi obtenu, il sera possible d'observer le profil d'expression propre à ce ou ces amplificateurs. Ces constructions peuvent s'insérer partout dans le génome de telle sorte qu'en accumulant un grand nombre de lignées transgéniques indépendantes nous soyons en mesure de rechercher la présence d'amplificateurs dans le génome entier.

Comme le génome contient un grand nombre d'amplificateurs, de nombreuses insertions révèleront des modes d'expression reproductibles et spécifiques de certains tissus (figure 23-12). Ces modes reflètent ceux d'amplificateurs propres à des gènes adjacents aux insertions ; ceux-ci pourront ensuite être identifiés et analysés par des techniques d'ingénierie génétique. La méthode de capture par amplificateurs permet d'identifier les gènes par leurs modes d'expression sans considération des phénotypes que peuvent produire certains de leurs allèles. C'est ce qui explique que la capture par amplificateurs soit devenue une approche complémentaire des techniques de mutagénèse classiques.

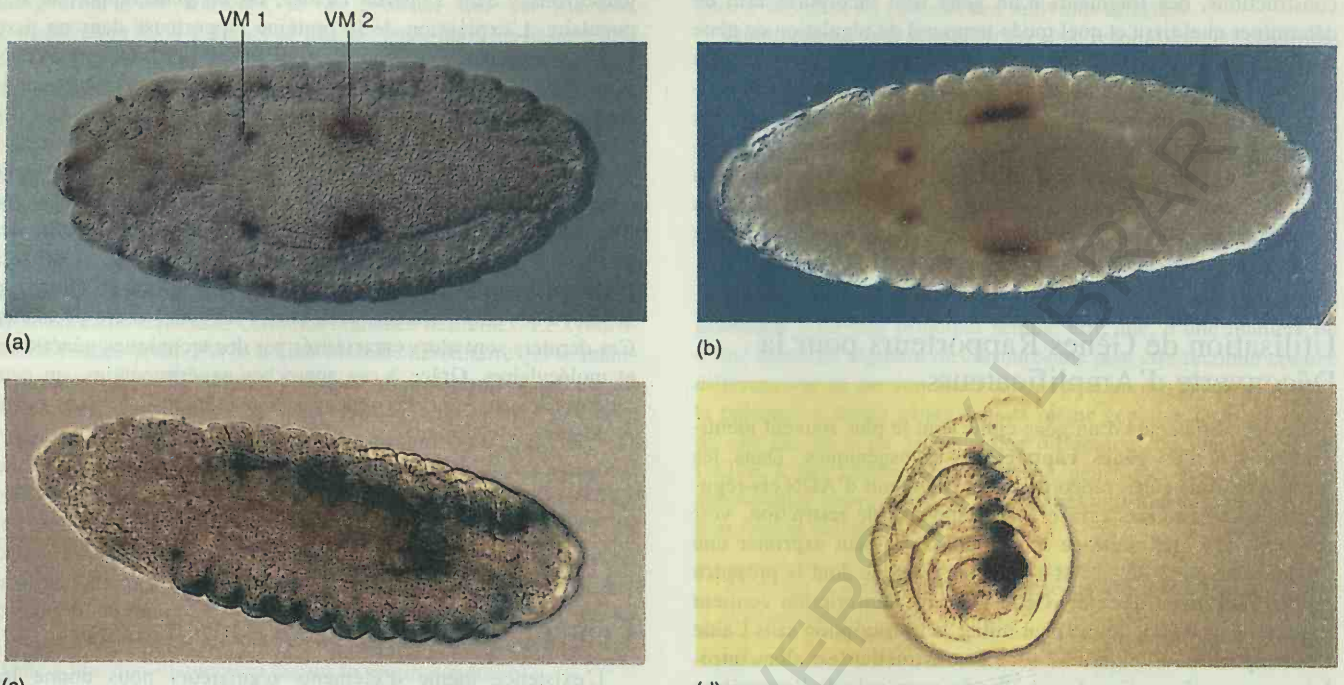


Figure 23-10. Quelques exemples illustrant la régulation à spécificité tissulaire complexe du gène *dpp* de *Drosophila*. Dans les encadrés a, c et d, la couleur bleue est due à une coloration histochimique reflétant l'activité de la β-galactosidase (la protéine codée par le gène rapporteur *lacZ*). Les positions respectives des amplificateurs *dpp* responsables des modes de coloration observés ici sont représentées dans la figure 23-3. (a) Activité du gène rapporteur révélant l'expression de *dpp* dans deux parties du mésoderme viscéral embryonnaire, précurseur de la musculature intestinale. La zone bleue de gauche indique l'amplificateur VM1 qui contrôle l'expression de *dpp* dans la partie antérieure du mésoderme viscéral et la zone de droite l'amplificateur VM2 qui en contrôle l'expression dans la partie postérieure. (b) Test d'hybridation in situ pour détecter l'ARN de *dpp* dans le mésoderme viscéral. Noter que le profil d'expression coloré en bleu dans l'encadré a est le même que le profil d'expression d'ARN coloré en brun, ce qui confirme la validité du test rapporteur. (c) Expression du gène rapporteur contrôlée par un autre amplificateur de *dpp* (LE) dans l'ectoderme latéral d'un embryon. (d) Expression du gène rapporteur contrôlée par ID, l'un des nombreux amplificateurs de *dpp* spécifiques des disques imaginaux (un tel disque est un petit groupe aplati de cellules larvaires donnant naissance à l'un des appendices de l'adulte). Un secteur bleu correspondant à l'expression de *dpp* dans le disque imaginal d'une patte est représenté. (a et b ont été aimablement fournis par D. Hursh, c par R. W. Padgett et d par R. Blackman et M. Sanicola).

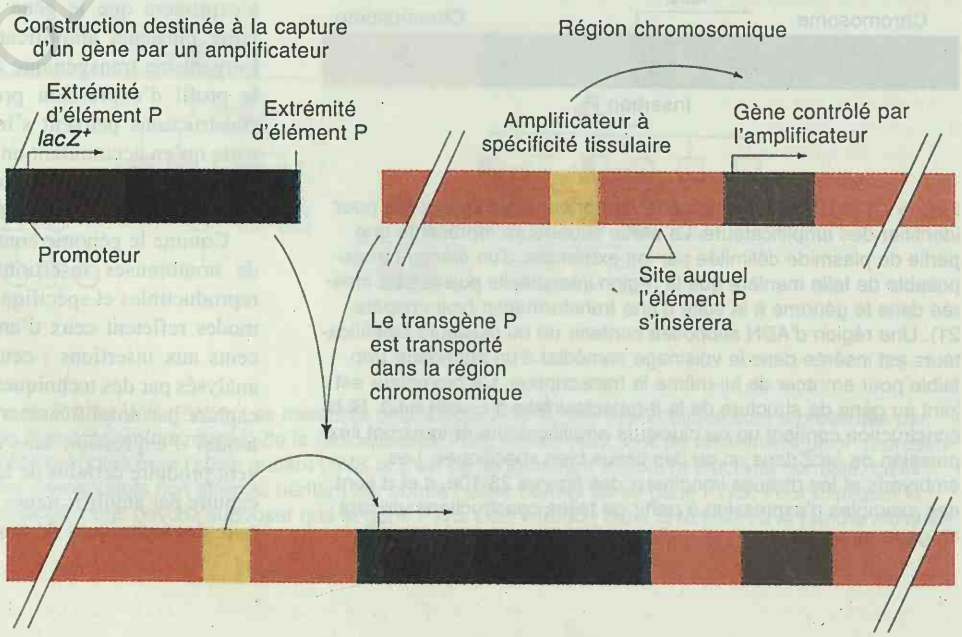


Figure 23-11. Capture de gènes à expression tissulaire spécifique par un amplificateur chez *Drosophila*. Le point essentiel dans cette méthode de capture est l'utilisation d'un gène marqueur (*lacZ* dans le cas présent) adjacent à un promoteur faible. Par contraste avec les constructions transgéniques utilisant un gène rapporteur (figure 23-9), celle-ci ne contient pas d'amplificateur de sorte que le gène *lacZ* ne sera exprimé que si la construction transgénique s'insère par transposition dans le voisinage d'un amplificateur. Donc des insertions du même trangène dans différentes régions du génome seront associées à différents modes d'expression tissulaire de *lacZ*. Le triangle indique le site auquel la construction transgénique s'est insérée par transposition.

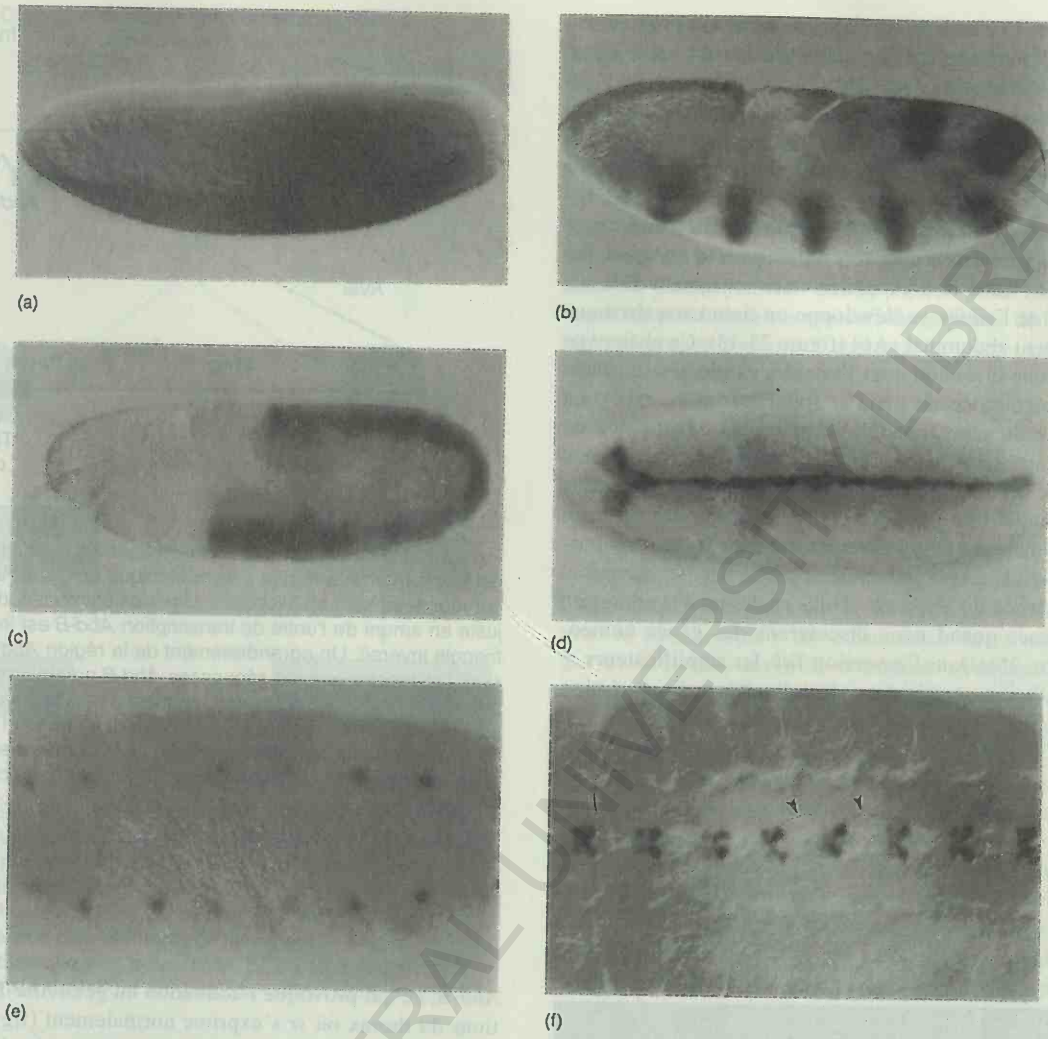


Figure 23-12. Exemples de modes d'expression dûs à des captures de gènes par amplificateurs au cours de l'embryogénèse. (a-c). Profils simulaires à ceux de gènes impliqués dans la segmentation de la larve. Aucun de ces gènes n'avait été précédemment identifié par mutation. (d-f). Expression corrélée avec des étapes définies dans le développement du système nerveux central. (Y. Hiromi, Departement de Biologie Moléculaire, Université de Princeton).

IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Eléments régulateurs et mutations dominantes

Les propriétés des éléments régulateurs nous permettent de mieux comprendre certaines classes de mutations dominantes. Nous pouvons répartir ces dernières en deux grandes catégories. Dans certains cas l'inactivation de l'une des deux copies d'un gène réduira la concentration de son produit au-dessous du seuil nécessaire à l'expression d'un phénotype normal ; il s'agira de mutations de perte de fonction dominantes. Dans d'autres cas, le phénotype dominant sera dû à quelque nouvelle propriété du gène muté et non à une réduction de son activité ; il s'agira de **mutations de gain de fonction dominantes.**

Les mutations de gain de fonction sont souvent des fusions de gènes. Celles-ci peuvent se produire aux points de rupture de réarrangements chromosomiques tels que les inversions, les translocations, les duplications ou les délétions (voir chapitre 8). Si ces fusions unissent des régions codantes elles peuvent mener à la production de protéines nouvelles. De telles protéines de fusion peuvent avoir des propriétés particulières engendrant des phénotypes dominants. Dans d'autres cas ce sera l'élément régulateur en cis d'un gène qui sera fusionné à la région transcrite d'un autre. Comme beaucoup d'éléments régulateurs en cis peuvent agir à des distances considérables et activer n'importe quel promoteur, ce type de fusion place l'unité de transcription d'un gène sous le contrôle de l'élément régulateur d'un autre gène. Cette situation conduit souvent à l'expression atypique d'un ARN codé par l'unité de transcription en question. Suivant la nature de la protéine produite et le tissu dans lequel elle apparaît, un phénotype dominant peut se manifester. La mutation dominante *Bar* chez la drosophile est un exemple classique d'une telle fusion. Dans le cas de cette

mutation, ce sont les éléments régulateurs en cis qui promeuvent normalement l'expression génétique dans l'oeil en cours de développement qui sont rattachés à un gène qui, normalement, ne s'exprime pas dans l'oeil. Ce gène code pour un facteur de transcription dont l'expression atypique provoque la mort de nombreuses cellules oculaires et se trouve ainsi responsable du phénotype *Bar* caractérisé par des yeux trop petits.

Dans quelques cas l'expression atypique de telles fusions est bien comprise au niveau moléculaire, comme pour la mutation *Tab* (*Transabdominale*) chez la drosophile. Chez un mutant *Tab* une partie du thorax de l'adulte se développe un tissu caractéristique du sixième segment abdominal (A6) (figure 23-13). Ce phénotype *ab* est associé à une inversion dont l'une des extrémités se trouve dans la région régulatrice du gène *sr* (pour «*striped*», rayé). La région régulatrice du gène *sr* induit normalement l'expression du gène adjacent dans certaines portions du thorax de la mouche. L'autre extrémité se situe près de l'unité de transcription du gène *Abd-B* (*Abdominal-B*). Ce gène code pour un facteur de transcription qui normalement est exprimé seulement dans les régions postérieures de l'animal et ce facteur confère un phénotype abdominal dans tous les tissus où il s'exprime. (Nous en dirons d'avantage au sujet de tels gènes quand nous discuterons des gènes homéotiques au chapitre 25). Dans l'inversion *Tab*, les amplificateurs *sr* spécifiques du thorax sont juxtaposés à l'unité de transcription

Figure 23-13. La mutation *Tab*. La mouche de gauche est un mâle sauvage. Celle de droite est un hétérozygote mâle au phénotype mutant pour le gène *Tab*. Chez ce dernier, une partie du thorax (le tissu noir) est modifié en tissu de la portion dorsale d'un des segments abdominaux postérieurs. Le restant du thorax est normal. (S. Celniker et E. B. Lewis, *Genes and Development* 1, 1987,111).

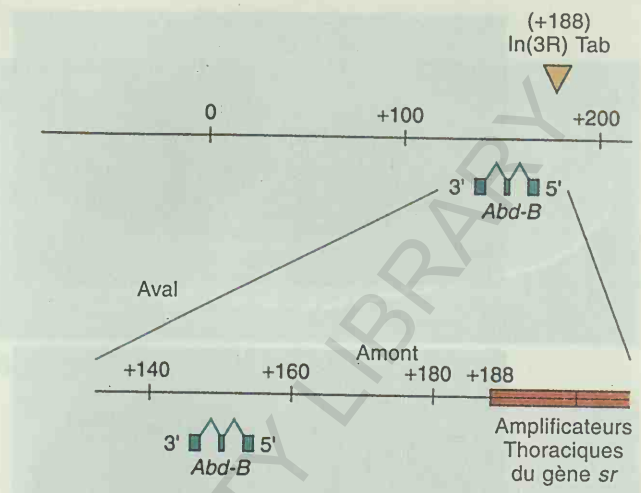


Figure 23-14. L'inversion chromosomique *Tab*. La ligne supérieure est une carte de la région chromosomique du gène *Abd-B*. Les coordonnées sont en kilobases. Une des extrémités de l'inversion, juste en amont de l'unité de transcription *Abd-B* est indiquée par le triangle inversé. Un agrandissement de la région *Abd-B* dans l'inversion *Tab* montre que les séquences *Abd-B* normalement situées au-delà de la position 188 kb sont remplacés par des séquences adjacentes à l'autre extrémité, qui se trouve dans le gène *sr*. L'inversion *Tab* amène l'unité de transcription *Tab* en contact avec les amplificateurs responsables de l'expression du gène *sr* dans certains tissus du thorax.

Abd-B, ce qui provoque l'activation du gène *Abd-B* dans ces portions du thorax où *sr* s'exprime normalement (figure 23-14). De par sa fonction *Abd-B* modifie les cellules du thorax où il est ainsi amené à s'exprimer en cellules de l'abdomen postérieur. Ceci constitue donc un exemple bien compris de mutation dominante.

Les fusions de gènes sont une importante source de variation puisqu'elles mènent à la synthèse de protéines nouvelles et de nouveaux profils d'expression génétique. Au chapitre 24 nous verrons que de telles mutations peuvent aussi jouer un rôle clef dans la genèse et la progression de certains cancers.

Message La fusion d'amplificateurs spécifiques de certains tissus à des gènes qui leur sont étrangers peut provoquer des phénotypes mutants dominants.

Cascades régulatrices : implication de mécanismes de régulation dans des étapes décisives du développement

Dans les sections précédentes, nous avons fait connaissance avec des mécanismes qui opèrent à différents niveaux pour contrôler la production de protéines spécifiques au moment opportun, à l'emplacement correct et en quantités appropriées. Les eucaryotes combinent ces mécanismes de différentes manières pour contrôler

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

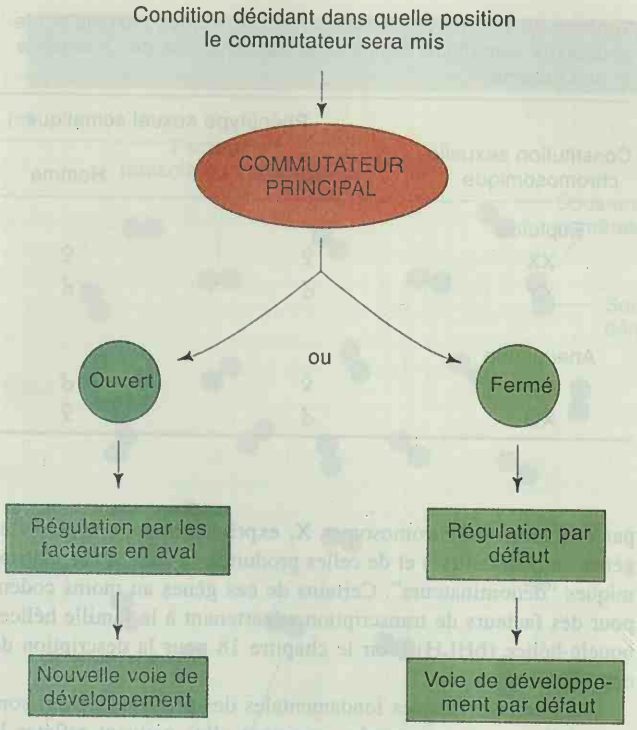


Figure 23-15. Etape de décision dans une voie du développement. Au cours du développement les cellules en viennent à assumer des rôles différents par une série de décisions binaires (de tout ou rien). Les conditions intracellulaires permettent de contrôler un commutateur principal. Une fois celui-ci en position «ouvert» il met en mouvement une cascade d'événements de contrôles en aval qui engagent la cellule dans une voie déterminée. Si le commutateur reste en position «fermé», la cellule s'engage par défaut dans la voie alternative.

le développement. Un scénario courant est la mise en jeu ordonnée d'une série de mécanismes de régulation de manière à former une **voie de développement** bien définie (figure 23-15). Dans une première partie de cette voie les cellules sont mises en mesure de produire une protéine régulatrice essentielle. Une fois la décision prise, la production de cette protéine est effectivement déclenchée ou suspendue. Il s'ensuit alors une «cascade» au cours de laquelle une succession de protéines régulatrices seront produites, menant à l'accomplissement de la décision.

Les voies du développement peuvent mettre en oeuvre tous les mécanismes susceptibles de contrôler l'expression d'une protéine active. Pour mettre en évidence la variété des mécanismes qui se sont développés au cours de l'évolution pour produire les protéines appropriées au bon moment et au bon endroit, examinons trois exemples. Deux concernent les solutions fort différentes que la drosophile et les mammifères mettent en oeuvre pour différencier leurs sexes respectifs. Le troisième concerne le système immunitaire des vertébrés et explore l'élégant mécanisme qui contrôle la production des anticorps par les lymphocytes B. Chez la drosophile, la différenciation sexuelle implique des interactions entre régulations opérant aux niveaux de la transcription et de la maturation de l'ARNm. Chez les mammifères, la détermination du sexe repose surtout sur le contrôle d'un facteur de transcription par un autre. Dans la production des anticorps, les gènes responsables sont contrôlés par des réarrangements de séquence de l'ADN qui génèrent une grande diversité d' anticorps et permet ainsi d'assurer une réponse immunitaire adéquate.

La détermination du sexe chez *Drosophila*

La dualité sexuelle est très répandue chez les êtres vivants. Chez nombre d'organismes la détermination sexuelle va de pair avec la transmission d'un chromosome hétéromorphe chez l'un des sexes. Le mécanisme de détermination du type XX-XY semble être apparu de manière indépendante à plusieurs reprises au cours de l'évolution, avec comme corollaire que les mécanismes responsables peuvent différer considérablement ainsi que nous le verrons en comparant la drosophile aux mammifères. Chez les deux, plusieurs parties du corps développent des caractères sexuellement dimorphiques, ce qui signifie qu'elles diffèrent par leur aspect entre mâles et femelles. Chez *Drosophila*, par exemple, les deux sexes diffèrent par la structure des organes sexuels et par la pigmentation de l'abdomen. Le mâle possède des excroissances sur la partie antérieure des pattes qui sont absentes chez les femelles. De tels caractères sexuels secondaires seront notre propos principal dans ce qui suit.

La différenciation sexuelle de la drosophile requiert la mise en oeuvre de plusieurs contrôles successifs (figure 23-16). Voyons maintenant l'ensemble de cette voie avant de l'examiner en détail.

Logique de Base de la Cascade Régulatrice

C'est le rapport du nombre de chromosome X à celui des jeux d'autosomes (ou rapport X :A) dans l'embryon qui décide si la mouche sera mâle ou femelle. Le mécanisme de cette décision a été déchiffré par l'élégant travail de Thomas Cline, Bruce Baker et leurs collègues. Le cours pris par la différenciation sexuelle est l'oeuvre d'un commutateur génétique majeur et de plusieurs gènes agissant en aval, l'ensemble formant une voie où des facteurs de transcription différents (selon qu'il s'agisse de produire un mâle ou une femelle) sont produits par un mécanisme de maturation différentielle de l'ARN transcrit.

Au cours de la première étape, chaque cellule de l'embryon "calcule" son rapport X :A qui se reflète dans la concentration de certains facteurs de transcription codés par le chromosome X. Si la concentration est suffisante (comme dans les embryons XX, destinés à devenir femelles) le gène commutateur principal est activé et si elle est trop faible il ne l'est pas. Dans le premier cas, un certain ARN est épissé de manière à produire un facteur de transcription qui réprime les gènes spécifiques de l'état mâle. Dans le deuxième cas, la maturation produit une autre forme d'ARNm qui code pour une forme différente du facteur de transcription, pouvant réprimer seulement les gènes spécifiques de l'état femelle.

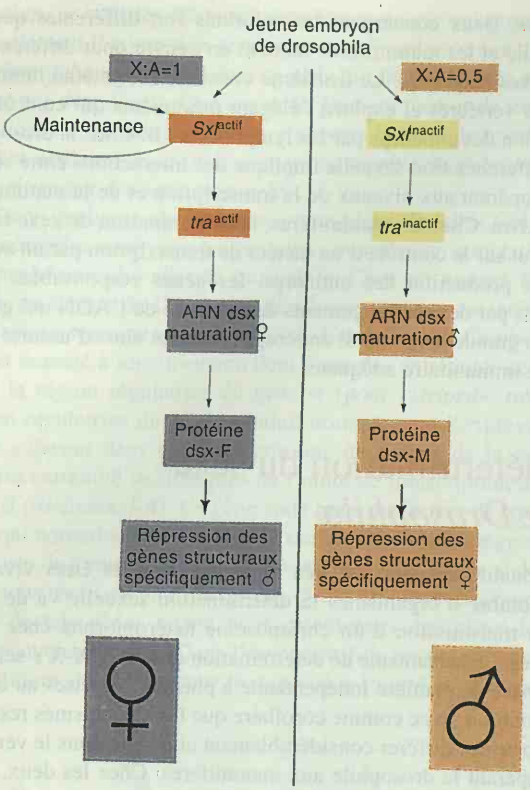


Figure 23-16. La voie de la détermination et de la différentiation sexuelle chez *Drosophila*. Le rapport X:A (décrit dans la section suivante) est évalué par l'interaction des facteurs de transcription dits numérateurs et dénominateurs. Ceci déterminera si *Sxl* doit être activé en permanence ou rester inactif. Si *Sxl* est activé, la voie de différentiation femelle est amorcée, ce qui amène l'ARNm du gène *dsx* à subir une maturation qui produit un facteur de transcription réprimant les gènes mâles. Si *Sxl* reste inactif, le mode de maturation par défaut de *dsx* produit un ARNm codant pour un facteur de transcription réprimant les gènes femelles.

Le rôle du Rapport X:A

Chez *Drosophila*, la base chromosomique de la détermination du sexe réside dans le rapport du nombre de chromosomes X à celui des *jeux* d'autosomes. (Rappelez-vous que chez la drosophile, $n = 4$ – un chromosome sexuel et trois différents autosomes. Donc, un jeu d'autosomes, que nous représenterons par A, comprend les trois différents autosomes et chez un diploïde A = 2). L'effet du rapport X :A peut s'apprécier le mieux en examinant des aneuploïdes pour le chromosome sexuel (voir le tableau 23-1). Un diploïde de drosophile 2X normal (XX AA) possède un rapport X :A de 1.0 et est phénotypiquement femelle. Un diploïde XY (XY AA) possède un rapport de 0.5 et est mâle ; un diploïde XO est aussi mâle mais stérile. Les triploïdes XXX AAA sont femelles, les XYY AAA sont mâles et les individus XXY AAA sont intermédiaires (intersexués).

Le rapport X:A est établi par une interaction entre protéines synthétisées dans l'ovaire de la mère et dans le zygote. Des observations génétiques suggèrent que la base moléculaire du rapport X:A réside dans les concentrations relatives de protéines produites

Tableau 23-1. Effet de la dose de chromosomes sexuels sur le phénotype somatique sexuel chez des diploïdes de *Drosophila* et de l'Homme.

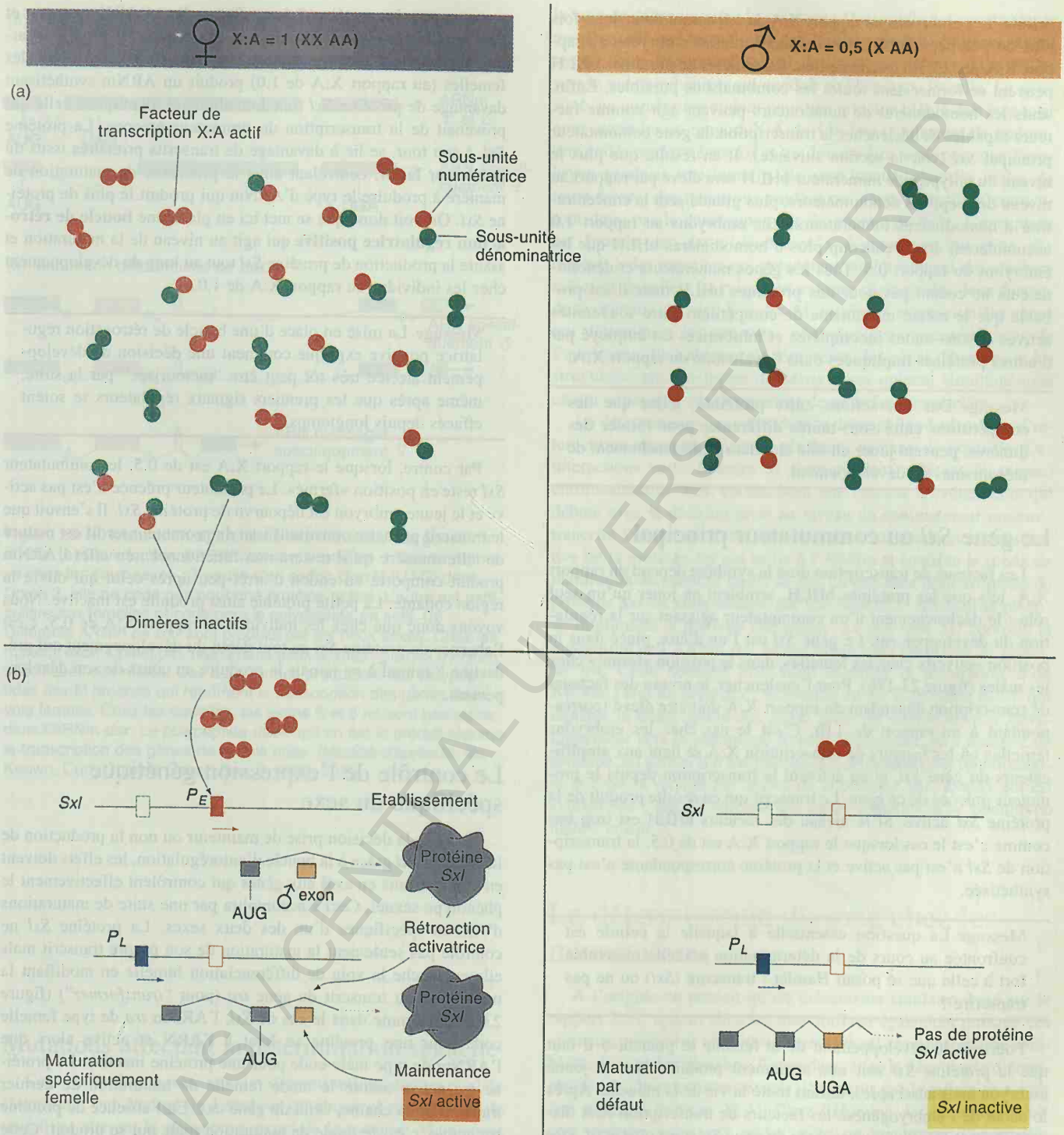
Constitution sexuelle chromosomique	Phénotype sexuel somatique	
	Drosophila	Homme
Euploïde		
XX	♀	♀
XY	♂	♂
Aneuploïde		
XXY	♀	♂
XO	♂	♀

par des gènes de chromosomes X, exprimés dans le zygote (les gènes "numérateurs") et de celles produites par des gènes autosomiques "dénominateurs". Certains de ces gènes au moins codent pour des facteurs de transcription appartenant à la famille hélice-boucle-hélice (bHLH) (voir le chapitre 18 pour la description de cette famille).

Deux caractéristiques fondamentales des protéines bHLH sont essentielles pour comprendre comment elles peuvent refléter le rapport X :A. Tout d'abord il semble que les protéines bHLH agissent à l'état de dimères, soit d'homodimères (formés de deux chaînes polypeptidiques identiques) soit d'hétérodimères. Ensuite, chez certains polypeptides de la famille bHLH il manque la partie nécessaire à la liaison avec l'ADN. Néanmoins, ces protéines peu-

Figure 23-17. (en face). Mise et maintien en position «ouvert» du commutateur *Sxl*. (a) Un mécanisme plausible pour les effets moléculaires du rapport X:A. Durant les premières étapes de l'embryogénèse les gènes numérateurs et dénominateurs sont exprimés. Les sous-unités polypeptidiques numératrices (cercle rouge) codées par des gènes du chromosome X et dénominatrices (cercles verts) codées par des gènes autosomiques forment des dimères en s'assemblant au hasard. Seuls les dimères du type numérateur/numérateur sont des facteurs de transcription actifs. Lorsque le rapport X:A est de 1.0 ces dimères numérateur/numérateur sont formés en relativement grandes quantités. Lorsque le rapport X:A est de 0.5, la plupart des sous-unités numératrices forment des dimères avec les sous-unités dénominatrices, plus abondantes. (b) Le commutateur *Sxl*. Des quantités élevées de dimères numérateur/numérateur activent la transcription à partir du promoteur précoce (P_E) de *Sxl*. (Les promoteurs activés sont représentés par des rectangles pleins rouges ou bleus, les promoteurs inactivés par des rectangles vides). A une étape plus tardive de l'embryogénèse, P_E est inactivé et la transcription de *Sxl* s'opère chez tous les animaux à partir du promoteur tardif P_L. En se liant au transcrit primaire issu de P_L et en contrôlant son mode de maturation (c'est-à-dire en empêchant l'exon mâle d'être inclus dans l'ARNm final) la protéine préexistante Sxl assure sa propre production future puisqu'elle entretient le mode de maturation menant à sa propre formation. Une boucle d'autorégulation positive s'installe donc. Par contre, lorsque le rapport X:A est de 0.5, P_E n'est pas activé. Aucune protéine Sxl n'est donc présente dans le jeune embryon et la maturation du transcrit issu de P_L génère un ARNm qui contient l'exon mâle. Cet exon contient un codon stop (UGA) terminant prématurément le polypeptide Sxl. Cette protéine raccourcie produite chez les mâles n'est pas fonctionnelle. AUG dénote l'emplacement du codon de départ dans l'ARNm de la protéine Sxl.

ROTHMAN CENTENNIAL UNIVERSITY LIBRARY



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

vent former des dimères avec d'autres polypeptides bHLH. Ces protéines dépourvues du site de liaison avec l'ADN agissent probablement comme inhibiteurs des protéines bHLH capable de liaison car dans les dimères formés par assemblage des deux types de protéines, la présence de la sous-unité incomplète empêche l'autre de reconnaître sa cible spécifique sur l'ADN.

Il semble que les protéines bHLH "mesurent" le rapport X:A du fait de la compétition qui s'exerce entre elles pour former des facteurs de transcription actifs (voir figure 23-17a). Bien que nous ne disposions pas encore de tous les éléments, le schéma suivant semble se dégager. Tout d'abord, certains gènes numérateurs (situés sur le chromosome X) codent pour des protéines bHLH reconnaissant l'ADN tandis que d'autres (situées sur les autosomes) déterminent des polypeptides bHLH sans activité de liaison. Ensuite, chacun des polypeptides bHLH est synthétisé au prorata du nombre de copies de chaque gène bHLH présent dans la

cellule. Les embryons au rapport X:A de 1.0 auront donc deux fois plus de polypeptide bHLH numérateur que les embryons au rapport X:A de 0.5. En troisième lieu, les dimères de protéines bHLH peuvent se former dans toutes les combinaisons possibles. Enfin, seuls les homodimères de numérateurs peuvent agir comme facteurs capables de déclencher la transcription du gène commutateur principal *Sxl* (voir la section suivante). Il en résulte que plus le niveau du polypeptide numérateur bHLH sera élevé par rapport au niveau des peptides dénominateurs, plus grande sera la concentration d'homodimères numérateurs. Les embryons au rapport 1.0 accumuleront donc beaucoup plus d'homodimères bHLH que les embryons au rapport 0.5. Tous les gènes numérateurs et dénominateurs ne codent pas pour des protéines bHLH mais il est probable que le même mécanisme de compétition entre sous-unités actives et sous-unités incomplètes et inhibitrices est employé par d'autres protéines impliquées dans l'évaluation du rapport X:A.

Message Des interactions entre protéines, telles que des compétitions entre sous-unités différentes pour former des dimères, peuvent jouer un rôle clef dans le déclenchement de mécanismes du développement.

Le gène *Sxl* ou commutateur principal

Les facteurs de transcription dont la synthèse dépend du rapport X:A, tels que les protéines bHLH, semblent ne jouer qu'un seul rôle : le déclenchement d'un commutateur agissant sur la régulation du développement. Le gène *Sxl* est l'un d'eux, placé dans la position «ouvert» chez les femelles, dans la position «fermé» chez les mâles (figure 23-17b). Pour l'enclencher, le niveau des facteurs de transcription dépendant du rapport X:A doit être élevé (correspondant à un rapport de 1.0). C'est le cas chez les embryons femelles où les facteurs de transcription X:A se lient aux amplificateurs du gène *Sxl*, et en activent la transcription depuis le promoteur précoce de ce gène. Le transcrit qui en résulte produit de la protéine *Sxl* active. Si le niveau des facteurs bHLH est trop bas comme c'est le cas lorsque le rapport X:A est de 0.5, la transcription de *Sxl* n'est pas active et la protéine correspondante n'est pas synthétisée.

Message La question essentielle à laquelle la cellule est confrontée au cours de la détermination sexuelle ressemble fort à celle que se posait Hamlet : transcrire (*Sxl*) ou ne pas transcrire ?

Pour que le développement de la femelle se poursuive il faut que la protéiine *Sxl* soit non seulement produite dans le jeune embryon mais aussi après, durant toute la vie de la mouche. Après le début de l'embryogénèse les facteurs de transcription X:A disparaissent et le promoteur précoce du gène *Sxl* n'est plus actif. Dès lors comment la transcription de *Sxl* peut-elle se poursuivre chez les animaux au rapport X:A de 1.0 ? Comme nous allons le voir, la production ultérieure de la protéine *Sxl* dépend de sa production précoce (figure 23-17b). Après les premières étapes de l'embryogénèse, la transcription de *Sxl* se produit de manière constitutive à partir du promoteur tardif du même gène. Cependant, le transcrit primaire résultant de la transcription du gène *Sxl* à partir de ce promoteur est beaucoup plus long que le transcrit primaire venant du promoteur précoce et il est sujet à un mécanisme de maturation qui opère de manière différente suivant que la protéine *Sxl* soit présente ou non. La protéine *Sxl*, en effet, se lie à l'ARN messager et peut modifier le mode de maturation du transcrit *Sxl* produit à partir du promoteur tardif. Le mode de maturation propre aux des femelles (au rapport X:A de 1.0) produit un ARNm synthétisant davantage de protéine *Sxl* fonctionnellement identique à celle qui provenait de la transcription du promoteur précoce. La protéine *Sxl*, à son tour, se lie à davantage de transcrits primaires issus du promoteur tardif, contrôlant ainsi le processus de maturation de manière à produire le type d'ARNm qui produit le plus de protéine *Sxl*. On voit donc que se met ici en place une **boucle de rétroaction régulatrice positive** qui agit au niveau de la maturation et assure la production de protéine *Sxl* tout au long du développement chez les individus au rapport X:A de 1.0.

Message La mise en place d'une boucle de rétroaction régulatrice positive explique comment une décision de développement arrêtée très tôt peut être "mémorisée" par la suite, même après que les premiers signaux régulateurs se soient effacés depuis longtemps.

Par contre, lorsque le rapport X:A est de 0.5, le commutateur *Sxl* reste en position «fermé». Le promoteur précoce n'est pas activé et le jeune embryon est dépourvu de protéine *Sxl*. Il s'ensuit que le transcrit primaire constitutif issu du promoteur tardif est maturé de telle manière qu'il restera non fonctionnel ; en effet l'ARNm produit comporte un codon d'arrêt peu après celui qui ouvre la région codante. La petite protéine ainsi produite est inactive. Nous voyons donc que chez les individus au rapport X:A de 0.5, c'est l'absence de protéine *Sxl* au tout début du développement qui prédestine l'animal à ne jamais la produire au cours de son développement.

Le contrôle de l'expression génétique spécifique du sexe

Une fois la décision prise de maintenir ou non la production de la protéine *Sxl* grâce à la boucle d'autorégulation, les effets doivent en être transmis en aval aux gènes qui contrôlent effectivement le phénotype sexuel. Ceci s'accomplira par une suite de maturations d'ARNm spécifiques d'un des deux sexes. La protéine *Sxl* ne contrôle pas seulement la maturation de son propre transcrit mais elle enclenche la voie de différenciation femelle en modifiant la maturation du transcrit du gène *tra* (pour "*transformer*") (figure 23-18a). Comme dans le cas de *Sxl*, l'ARNm *tra* de type femelle code pour une protéine se liant à l'ARN et active alors que l'ARNm de type mâle code pour une protéine inactive. La protéine *tra* active assure le mode femelle de maturation du dernier transcrit de la chaîne, celui du gène *dsx*. En l'absence de protéine *tra* active, c'est le mode de maturation mâle qui se produit. Cette fois les modes femelles et mâles de la maturation de *dsx* aboutissent tous deux à la synthèse de protéines actives, que nous appellerons respectivement dsx F- et dsx-M (figure 23-18b). Sans cette régulation par les facteurs de transcription dsx, les gènes en aval seraient transcrits constitutivement. Les protéines dsx répriment la transcription de certains de ces gènes spécifiques du sexe. En l'occurrence, la protéine dsx-F réprime la transcription des gènes mâles et confère dès lors le phénotype femelle. Réciproquement, la protéine dsx-M réprime la transcription des gènes femelles, ce qui assure le phénotype mâle.

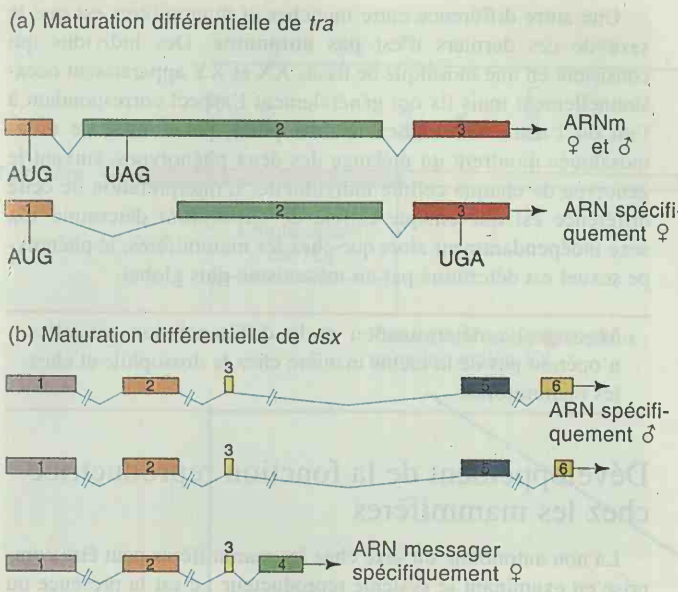


Figure 23-18. Maturation différentielle des transcrits des gènes *tra* et *dsx*. (a) Deux formes d'ARNm *tra* sont produites. L'une se retrouve chez les deux sexes ; à cause d'un codon d'arrêt (UAG) dans l'exon 2, elle ne code pas pour une protéine active. L'autre est particulière aux femelles et code pour le polypeptide *tra* actif. (b) Différents ARNm de *dsx* sont produits par les deux sexes. Chez les mâles, l'exon 4 n'est pas repris dans deux formes voisines d'ARNm spécifiques des mâles. Ces deux formes produisent des polypeptides dsx-M proches qui répriment la transcription des gènes de la voie femelle. Chez les femelles, les exons 5 et 6 ne sont pas repris dans l'ARNm *dsx*. Le polypeptide *dsx-F* qui en est le produit réprime la transcription des gènes de la voie mâle. (Modifié d'après M. Mc Keown, Curr. Opinion Genet. Dev. 2, 1992, 301).

Mutations affectant la détermination sexuelle

Ces éclaircissements sur la détermination du sexe chez *Drosophila* ont émergé de l'analyse génétique et moléculaire de mutations altérant le phénotype sexuel de la mouche. Maintenant que nous avons décrit la séquence des événements, nous pourrons mieux comprendre les conséquences phénotypiques de certaines mutations dans les principaux gènes contrôlant cette voie du développement. L'effet de mutations nulles dans plusieurs d'entre eux est de transformer des femelles en mâles phénotypiques. Les mâles homozygotes pour ces mutations sont complètement normaux. Ce sera par exemple le cas des gènes *sis-b* (pour "*sister-less-b*"), *Sxl* ("*Sex-lethal*") et *tra* ("*transformer*"). Ces gènes sont superflus chez les mâles puisque la voie de développement mâle correspond à l'état "par défaut" du commutateur principal. En d'autres termes, la voie de détermination du sexe chez *Drosophila* est construite de manière telle que les activités de plusieurs produits de gènes soient requis pour détourner l'animal de l'état par défaut et l'aiguiller vers la voie productive, qui conduit au phénotype femelle. Le gène *sis-b*, un numérateur codant pour une protéine bHLH doit être actif pour atteindre un rapport X:A de 1.0. Les régulateurs de maturation codés par les gènes *Sxl* et *tra* doivent être actifs pour que l'embryon produise une femelle. Ils sont inactifs chez les mâles de toute façon ; des mutations rendant ces gènes défectifs n'entraveront donc pas le développement du phénotype mâle. L'exception est fournie par *dsx* ("*doublesex*"). L'annulation du gène *dsx* conduit à des mouches qui présentent simultanément des attributs mâles et femelles. La raison en est que chacune des deux formes de la protéine *dsx*, dsx-F et dsx-M, réprime l'expression des gènes qui déterminent les structures phénotypiques caractéristiques de l'autre sexe. En l'absence de répression, les gènes déterminant les structures caractéristiques des *deux* sexes opèrent simultanément ce qui conduit au développement de mouches bisexuelles.

La détermination sexuelle chez la drosophile résulte donc d'interactions mises en oeuvre à plusieurs niveaux de contrôle. Des interactions entre facteurs de transcription, reflétant le rapport chromosomique X:A, enclenchent une cascade d'événements qui débute avec la décision prise au niveau du commutateur majeur : trancrire *Sxl* ou non. Cette décision mène à la production constitutive de la protéine *Sxl* qui se lie à l'ARNm et contrôle le mode de maturation du transcrit tardif de *Sxl*. La présence ininterrompue de protéine *Sxl* est alors assurée par une boucle de rétroaction positive impliquant la protéine elle-même. La protéiine *Sxl* contrôle la maturation de l'ARNm *tra*, ce qui mène à la production de protéine *tra*. Cette dernière elle aussi contrôle la maturation d'un ARNm, celui du gène *dsx* ; le résultat en est la protéine dsx-F qui réprime la transcription des gènes mâles et oriente ainsi le développement vers le phénotype femelle. Par contre, en l'absence de protéine *Sxl* active, il n'est pas produit de protéine *tra* fonctionnelle et c'est la version par défaut de la protéine *dsx*, dsx-M qui est synthétisée ; dsx-M réprime les gènes femelles et le phénotype mâle s'ensuit.

La détermination du sexe chez les mammifères

A l'origine on pensait qu'un mécanisme similaire, basé sur le rapport X:A, opérait chez les mammifères également puisque ces animaux présentent un dimorphisme sexuel chromosomique semblable à celui des mouches. Cependant, avec la découverte d'aneuploïdes de chromosomes sexuels, il apparut que le mécanisme était fort différent (tableau 23-1). Chez l'Homme, les individus XXY sont phénotypiquement mâles avec un syndrome d'anomalies modérées (le syndrome de Klinefelter ; voir la figure 9-20). En comparaison les mouches XXY sont des femelles phénotypiquement normales. Les personnes XO présentent un certain nombre d'anomalies (le syndrome de Turner ; voir la figure 9-17), comme une taille réduite, un retard mental et des gonades vestigiales, mais ils sont clairement du sexe féminin par leur morphologie. En comparaison, les mouches XO sont mâles. Chez les mammifères la détermination du sexe est basée sur la présence ou l'absence d'un chromosome Y. Sans cet Y, l'individu devient une femme, avec lui, un homme.

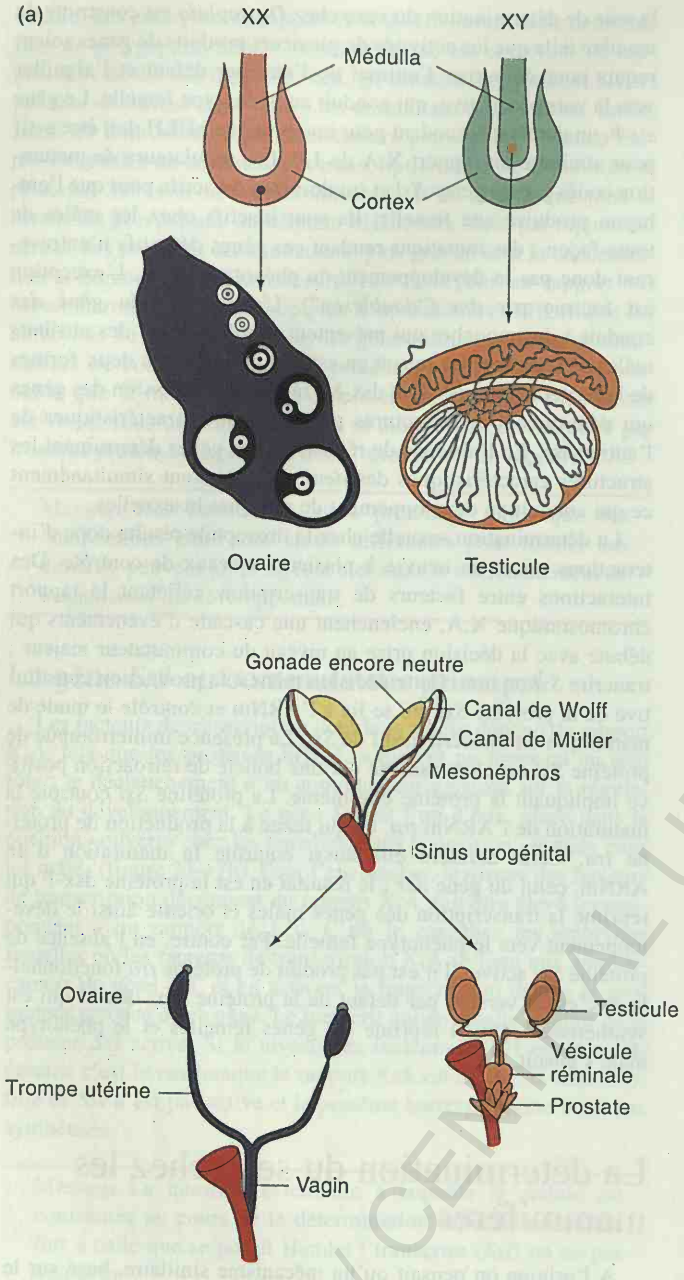


Figure 23-19. Développement du système urogénital des mammifères. (a) La crête embryonnaire génitale consiste en une médulla entourée par un cortex. Les cellules germinales femelles migrent dans le cortex et s'organisent en ovaire. Les cellules germinales mâles migrent dans la médulla et s'organisent en testicule. (b) Au stade initial de l'organisation urogénitale où la gonade est encore neutre, des précurseurs des canaux mâles (de Wolff) et femelles (de Müller) sont tous deux présents. Si un testicule est présent, il sécrète deux hormones, la testostérone et un polypeptide appelé substance (ou hormone) anti-Müllérienne. Cette sécrétion provoque la régression des canaux Mülleriens et induit le développement des canaux de Wolff en canaux reproducteurs mâles. Si c'est un ovaire qui est présent, ces deux substances sont absentes et c'est l'opposé qui se produit : les canaux de Wolff régressent et ceux de Müller se développent en canaux reproducteurs femelles. (D'après Ursula Mittwoch, *Genetics of Sex Differentiation*. Copyright © 1973 par Academic Press.

Une autre différence entre mouches et mammifères est que le sexe de ces derniers n'est **pas autonome**. Des individus qui consistent en une mosaïque de tissus XX et XY apparaissent occasionnellement mais ils ont généralement l'aspect correspondant à l'un ou l'autre sexe. Chez la drosophile, par contre, de telles mosaïques montrent un mélange des deux phénotypes, suivant le génotype de chaque cellule individuelle. L'interprétation de cette différence est que chaque cellule de *Drosophila* détermine son sexe indépendamment alors que chez les mammifères, le phénotype sexuel est déterminé par un mécanisme plus global.

Message La détermination et la différenciation sexuelles n'opèrent pas de la même manière chez la drosophile et chez les mammifères.

Développement de la fonction reproductrice chez les mammifères

La non autonomie du sexe chez les mammifères peut être comprise en examinant le système reproducteur : c'est la présence ou l'absence de testicules qui détermine les caractères sexuels secondaires.

Les gonades se forment pendant les deux premiers mois de la gestation chez l'Homme. Les premières cellules germinales migrent vers la crête génitale, située sur le rein embryonnaire. C'est le sexe chromosomique des cellules germinales qui détermine si elles resteront en surface ou migreront en profondeur dans la crête, s'organisant soit en testicules soit en ovaires (figure 23-19). Si un testicule est formé, ses cellules de Leydig sécrètent la testostérone, une hormone stéroïde androgène (déterminant le sexe mâle). Cette hormone se liera à des récepteurs spécifiques. Ceux-ci sont des protéines cytoplasmiques agissant comme facteurs de transcription mais cette activité même dépend de ce qu'il se soient préalablement liés à leur hormone spécifique. C'est donc le complexe récepteur-androgène qui va se lier à des amplificateurs spécifiques, activant ainsi l'expression des gènes mâles. Chez les individus génétiquement femelles, il ne se forme pas de cellules de Leydig, la testostérone n'est pas produite, le récepteur d'androgène reste inactif et l'individu poursuit son développement dans la voie femelle. C'est donc la présence ou l'absence de testicules qui détermine le phénotype sexuel, via la sécrétion de testostérone. En effet chez des individus XY dépourvus de récepteur androgène, le développement suit la voie femelle en dépit du fait que des testicules sont formés. Des mutations dans le gène de ce récepteur sont à la base du syndrome de féminisation testiculaire (Tfm, voir figure 3-22).

Rôle du chromosome Y dans la détermination sexuelle

Quel est l'événement qui amorce la détermination ? L'analyse génétique moléculaire a entrepris de caractériser le locus du chromosome Y directement impliqué dans la formation des testicules. Ce gène hypothétique a reçu le nom de "facteur déterminant les testicules", soit *TDF*, pour "testis-determining factor", chez l'Homme, *Tdy* chez la souris ; on sait maintenant qu'il est identique au gène *SRY/Sry*. *TDF* et *Tdy* ont été identifiés par cartographie génétique puis caractérisés par Robin Lovell-Badge et Peter Goodfellow à partir d'un syndrome commun à la souris et à l'Homme (figure 23-20), le syndrome d'inversion sexuelle. Les individus XX inversés sont phénotypiquement mâles et portent un

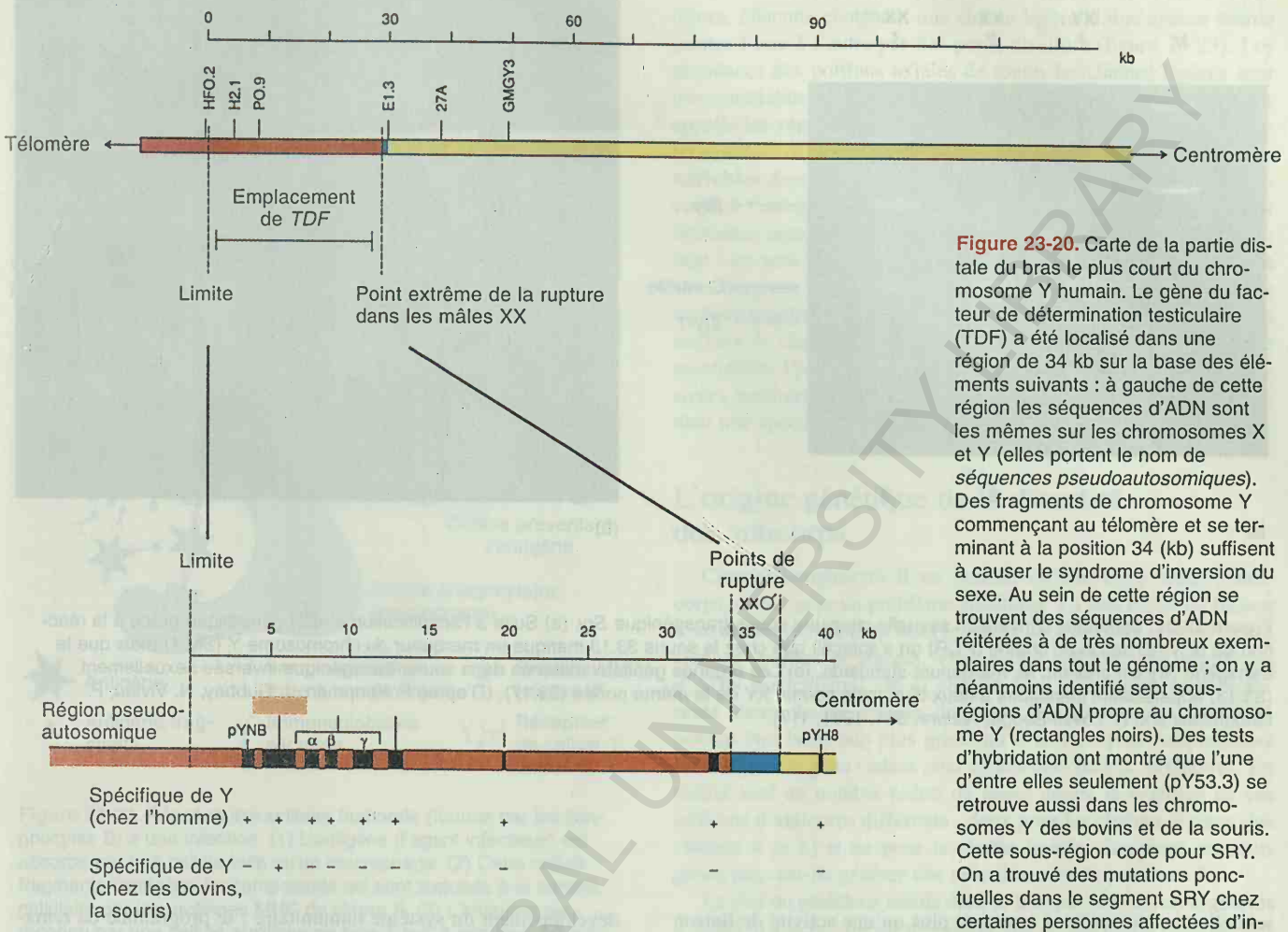


Figure 23-20. Carte de la partie distale du bras le plus court du chromosome Y humain. Le gène du facteur de détermination testiculaire (TDF) a été localisé dans une région de 34 kb sur la base des éléments suivants : à gauche de cette région les séquences d'ADN sont les mêmes sur les chromosomes X et Y (elles portent le nom de *séquences pseudoautosomiques*). Des fragments de chromosome Y commençant au télomère et se terminant à la position 34 (kb) suffisent à causer le syndrome d'inversion du sexe. Au sein de cette région se trouvent des séquences d'ADN réitérées à de très nombreux exemplaires dans tout le génome ; on y a néanmoins identifié sept sous-régions d'ADN propre au chromosome Y (rectangles noirs). Des tests d'hybridation ont montré que l'une d'entre elles seulement (pY53.3) se retrouve aussi dans les chromosomes Y des bovins et de la souris. Cette sous-région code pour SRY. On a trouvé des mutations ponctuelles dans le segment SRY chez certaines personnes affectées d'inversion sexuelle. (D'après A.H. Sinclair et al., *Nature* 346, 1990, 240).

fragment de chromosome Y intégré dans le génome. En général ces réarrangements résultent d'une recombinaison illégitime entre les chromosomes X et Y qui rattache un fragment de Y au bout d'un X. Cette portion de Y a été clonée par **arpentage chromosomique** (voir figure 14-17). Lovell-Badge et Goodfellow ont identifié un transcrit issu de cette région qui est exprimé à l'endroit approprié dans la capsule rénale en développement.

Le gène codant pour ce transcrit a reçu l'appellation de gène d'inversion sexuelle sur Y (en anglais "sex reversal on Y", donc *SRY* chez l'Homme, *Sry* chez la souris) puisqu'il a été identifié sur la base du syndrome d'inversion sexuelle. Il est néanmoins à peu près certain qu'il s'agit du même gène que *TDF/Tdy*. Lovell-Badge et Goodfellow se sont servi d'un transgène pour appuyer cette thèse, et de manière assez spectaculaire (figure 23-21). Un fragment cloné (14 kb) du chromosome Y de la souris, incluant le gène *Sry*, a été inséré dans le génome d'une souris par transformation de la lignée germinale. Un descendant XX contenant ce transgène *Sry* s'est révélé tout à fait mâle quant à son phénotype externe et interne et, comme prévu, avait développé les tissus somatiques du testicule, y compris les cellules de Leydig productrices de testostérone (cette souris était cependant stérile, ce qui résultait sans doute de la présence de deux chromosomes X dans la même cellule germinale, puisque les mâles XXY sont stériles également). Une seule unité d'expression génétique s'est donc révélée capable d'altérer profondément le phénotype sexuel d'un mammifère en complète concordance avec le rôle de déterminant du développement des testicules que joue le gène *SRY/Sry*.

Comment *SRY/Sry* influence-t-il la détermination sexuelle ? La protéine correspondante semble être un facteur de transcription. La protéine *SRY/Sry* comporte une séquence particulière, appelée HMG (pour groupe à haute mobilité) que l'on retrouve chez plusieurs autres facteurs de transcription. Certaines femelles XY inversées possèdent des mutations dans le domaine HMG de *SRY/Sry*. Alors qu'une protéine recombinante *SRY/Sry* produite à partir de mâles normaux se lie fortement à l'ADN, une protéine recombinante produite à partir des gènes *SRY/Sry* de ces individus

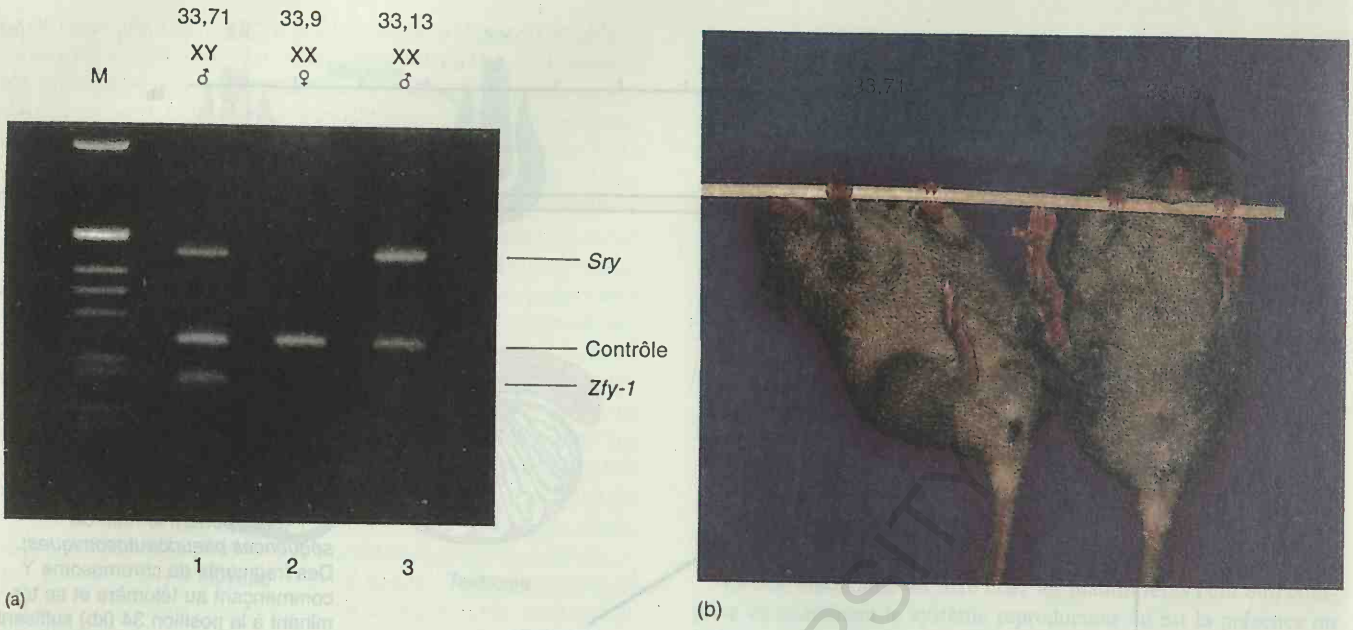


Figure 23-21. Syndrome d'inversion sexuelle chez une souris transgénique *Sry*. (a) Suite à l'amplification d'ADN génomique grâce à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) on s'aperçoit que chez la souris 33.13 manque un marqueur du chromosome Y (Zfy-1) mais que le transgène *Sry* est présent. M, marqueurs standards. (b) Les organes génitaux externes de la souris transgénique inversée sexuellement (33.13) apparaissent identiques à ceux d'un mâle normal XY de la même portée (33.17). (D'après P. Koopman, J. Gubbay, N. Viviau, P. Goodfellow and R. Lovell-Bedge, *Nature*, 351, 1991, 117).

sexuellement inversés ne montrent plus qu'une activité de liaison faible ou nulle. Comment la protéine *SRY/Sry* enclenche le développement des testicules n'est pas encore compris. Maintenant que la séquence du gène est connue, plusieurs perspectives se sont ouvertes pour tenter de répondre à cette question et à bien d'autres encore sur la base biologique du sexe.

Message Chez les mammifères, un gène du chromosome Y code pour un facteur de transcription qui transforme la gonade en testicule. Celui-ci produit des hormones androgènes qui circulent dans tout le corps de l'animal et activent leurs récepteurs spécifiques.

La voie de synthèse des anticorps : génération de leur diversité par remaniements de l'ADN

Nous venons de voir que différents niveaux de régulation génétique sont mis en oeuvre dans le contrôle des voies du développement. Sans doute le système immunitaire des vertébrés en constitue-t-il un exemple des plus raffinés car l'évolution y a produit des mécanismes originaux particulièrement bien adaptés à la fonction servie. Dans ce qui suit nous nous concentrerons sur un aspect du développement du système immunitaire : le programme de remaniements de l'ADN impliqué dans la production des anticorps.

Les anticorps et le système immunitaire

Le système immunitaire d'un vertébré est sa principale défense contre l'invasion par des organismes pathogènes tels que les virus, les bactéries et les champignons ; il joue sans doute aussi un rôle important comme mécanisme de veille contre l'apparition de cellules cancéreuses et participe à leur élimination. Le système est composé de plusieurs types de cellules dont les réponses coordonnées assurent une défense efficace contre l'irruption de substances ou de cellules étrangères (figure 23-22).

Les cellules du plasma et leurs précurseurs, les lymphocytes B (ou cellules B) sont celles qui fabriquent les **anticorps,** ou **immunoglobulines**, les protéines qui reconnaissent les substances étrangères, appelées **antigènes.** Chaque anticorps est construit de manière à reconnaître une structure stéréochimique spécifique d'un antigène particulier ; c'est ce qu'on appelle la *spécificité des anticorps*. Un antigène peut être tout ou partie d'une molécule et la plupart des molécules organiques de grande dimension peuvent se comporter comme antigènes. Il y a en fait des millions d'antigènes potentiels et le système immunitaire doit être à même d'en reconnaître le plus grand nombre possible. Il accomplit cette tâche en produisant une très grande diversité d'anticorps, chacun de ceux-ci pouvant se lier à un antigène particulier.

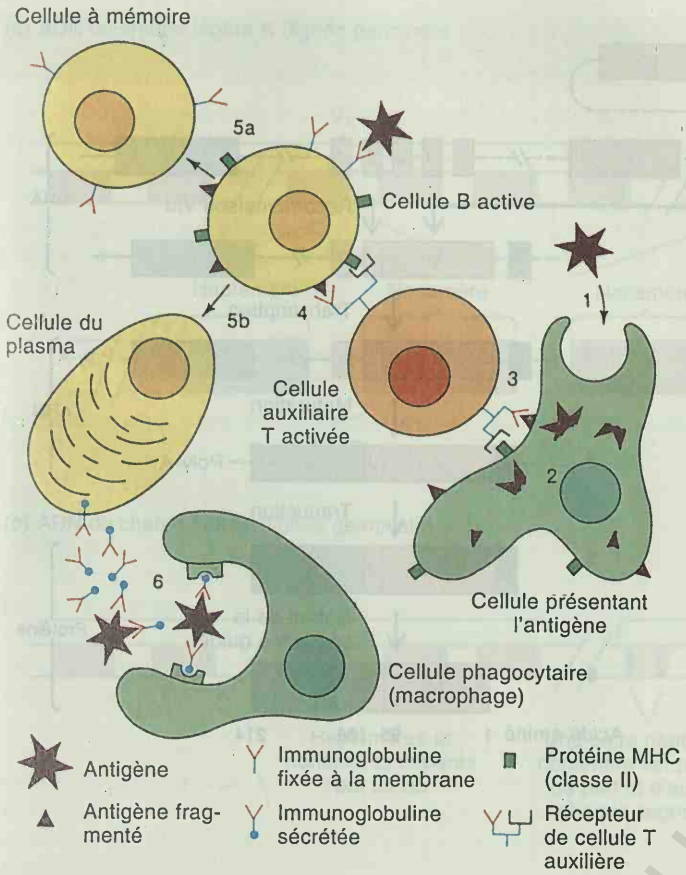


Figure 23-22. Réponse immunitaire humorale (fournie par les lymphocytes B) à une infection. (1) L'antigène (l'agent infectieux) est absorbé par une cellule telle qu'un macrophage. (2) Cette cellule fragmente l'antigène en composants qui sont exposés à la surface cellulaire par les protéines MHC de classe II. (3) L'antigène est reconnu par une cellule auxiliaire de type T qui, à son tour, (4) active des cellules B qui portent aussi des fragments de l'antigène. Ces cellules B activées ou bien (5a) se différencient en cellules à mémoire qui répondront à de futures infections causées par le même agent, ou (5b) deviennent des cellules du plasma qui sécrètent l'anticorps. (6) Les anticorps se lient à l'antigène, formant un complexe qui sera détruit par les macrophages. (D'après S. Tonegawa, "The Molecules of the Immune System." Copyright © 1985 par Scientific American, Inc. Tous droits réservés).

Une molécule d'anticorps est formée de deux sous-unités identiques, chacune contenant une chaîne légère et une chaîne lourde jointes l'une à l'autre par des ponts disulfure (figure 23-23). Les séquences des portions axiales de toutes les chaînes légères sont très semblables ; il en est de même pour les chaînes lourdes. On les appelle les **régions constantes.** Par contre, aux extrémités aminoterminales des chaînes d'anticorps se trouvent les **régions variables** dont les séquences d'acides aminés diffèrent d'un anticorps à l'autre ; au sein de ces régions variables se trouvent des domaines entre lesquels les différences s'accusent encore d'avantage : ce sont les **régions hypervariables.** Les anticorps se lient aux antigènes par leurs régions variables, aussi bien celles des chaînes lourdes que celles des chaînes légères. Ce sont en fait des milliers de chaînes légères et lourdes différentes qui peuvent être assemblées l'une à l'autre, produisant ainsi une panoplie de plusieurs millions d'anticorps différents, chacun d'entre eux possédant une spécificité de liaison particulière.

L'origine génétique de la diversité des anticorps

Chaque lymphocyte B ne produit qu'une seule sorte d'anticorps, ce qui pose un problème génétique. La spécificité de liaison d'un anticorps reflète en effet les séquences d'acides aminés de ses chaînes lourdes et légères, elles-même reflétant des séquences d'ADN particulières. Or, si chaque gène d'anticorps était représenté dans chaque cellule du corps, le génome des vertébrés devrait être beaucoup plus grand qu'il ne l'est pour accommoder les milliers de gène codant pour toutes ces chaînes différentes. En réalité seul un nombre réduit de gènes assure la synthèse de ces millions d'anticorps différents : deux pour les chaînes légères (les chaînes κ et λ) et un pour la chaîne lourde. Comment ces trois gènes peuvent-ils générer une telle diversité de protéines ?

La clef du problème réside dans le fait que ce sont des segments d'ADN distincts, chacun représenté par de multiples versions différentes, qui codent pour les différentes parties de la région

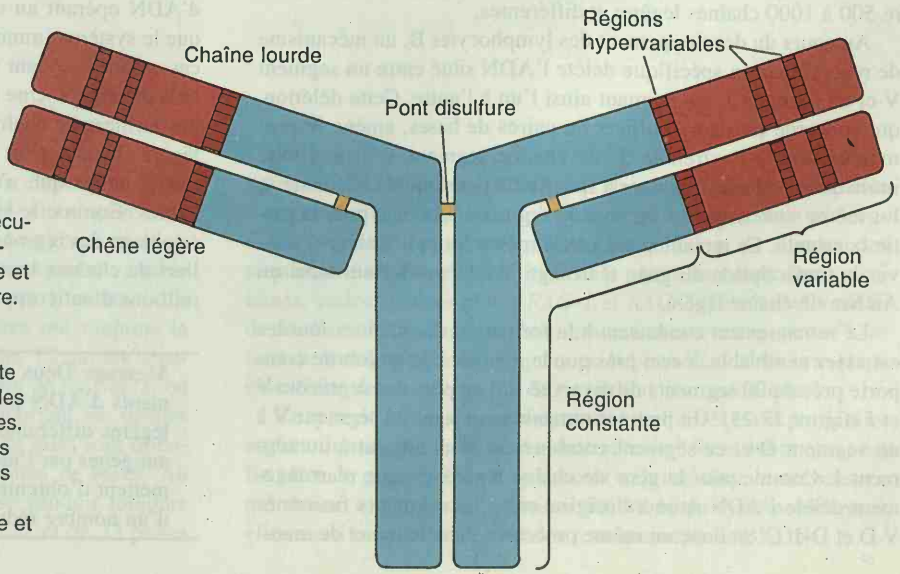


Figure 23-23. Structure d'un anticorps. La molécule est faite de deux paires de polypeptides identiques, dont chacune contient une chaîne légère et une chaîne lourde reliées par des ponts disulfure. Les régions constantes sont localisées dans la partie axiale ; les régions variables et hypervariables sont à l'extrémité des branches. Il n'existe qu'une seule région chromosomique (le "gène des chaînes lourdes") produisant des chaînes lourdes. Par contre, deux régions produisent des chaînes légères : le "gène des chaînes κ" et le "gène des chaînes λ". Dans un lymphocyte B ou dans une cellule du plasma, un seul type de chaîne légère et de chaîne lourde sont produits.

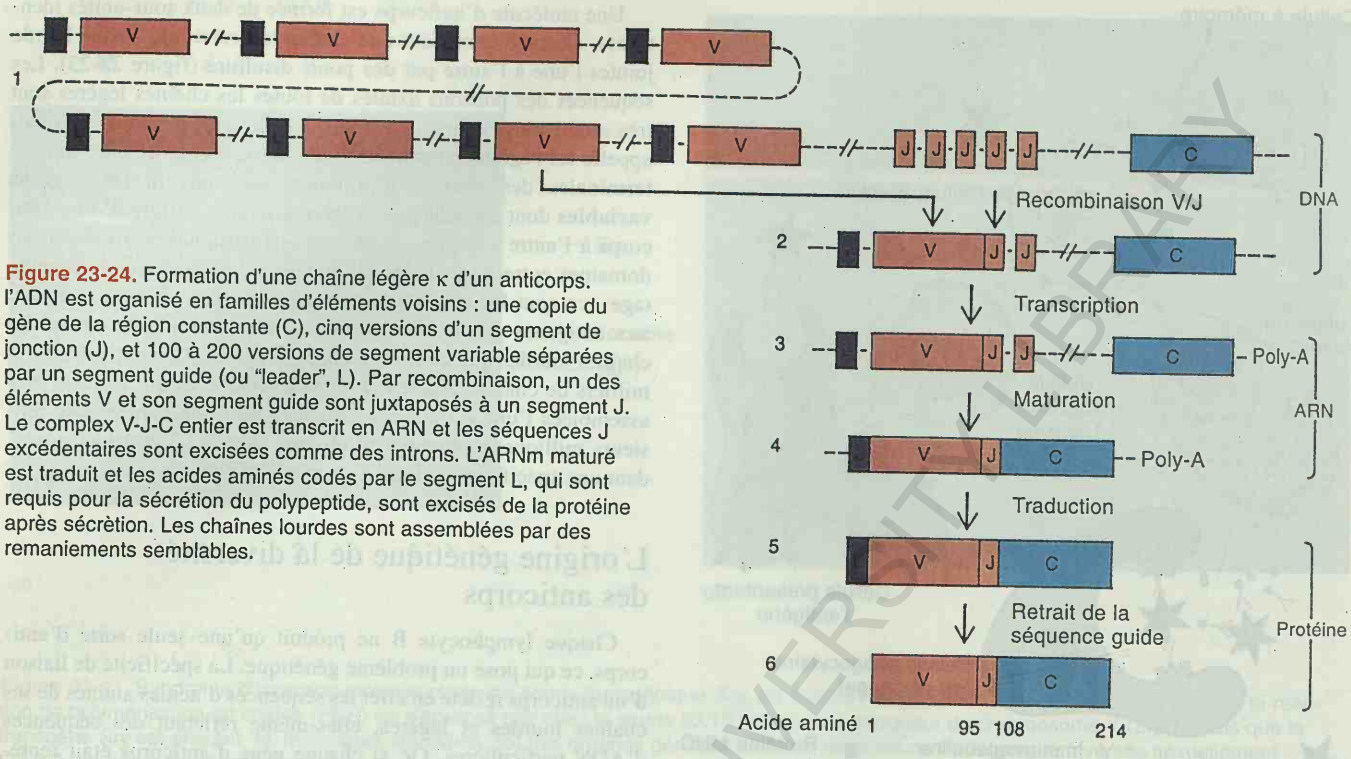


Figure 23-24. Formation d'une chaîne légère κ d'un anticorps. l'ADN est organisé en familles d'éléments voisins : une copie du gène de la région constante (C), cinq versions d'un segment de jonction (J), et 100 à 200 versions de segment variable séparées par un segment guide (ou "leader", L). Par recombinaison, un des éléments V et son segment guide sont juxtaposés à un segment J. Le complex V-J-C entier est transcrit en ARN et les séquences J excédentaires sont excisées comme des introns. L'ARNm maturé est traduit et les acides aminés codés par le segment L, qui sont requis pour la sécrétion du polypeptide, sont excisés de la protéine après sécrètion. Les chaînes lourdes sont assemblées par des remaniements semblables.

variable de chaque chaîne (figure 23-24). Ces segments distincts, appelé V et J, peuvent fusionner en toutes combinaisons possibles. Par exemple, n'importe quel segment V d'une chaîne légère κ peut s'assembler à n'importe quel segment J d'une chaîne κ. Dans les cellules germinales les segments V et J d'un gène de chaîne légère κ ne sont pas étroitement liés. En outre, il existe sans doute 100 à 200 versions différentes du segment variable (V) et environ cinq sortes de segments de jonction (J). Il est donc possible de produire 500 à 1000 chaînes légères κ différentes.

Au cours du développement des lymphocytes B, un mécanisme de recombinaison spécifique délète l'ADN situé entre un segment V et un segment J, les joignant ainsi l'un à l'autre. Cette délétion, qui concerne plusieurs milliers de paires de bases, amène le promoteur situé à l'extrémité 5' de chaque segment V à proximité immédiate de l'amplificateur à spécificité tissulaire de la chaîne κ, lui-même situé dans le voisinage du segment C, codant pour la partie constante. Ce remaniement met à même l'amplificateur d'activer la transcription du gène réarrangé V-J-C, produisant ainsi un ARNm de chaîne légère.

Le remaniement conduisant à la formation des chaînes lourdes est assez semblable, à ceci près que le gène de chaîne lourde comporte près de 20 segments de diversité (D) en plus des segments V et J (figure 23-25). Un premier remaniement joint un segment V à un segment D et ce segment combiné est alors adjoint à un segment J. Comme pour le gène de chaîne légère, chaque réarrangement délète l'ADN situé à l'origine entre les segments fusionnés V-D et D-J. C'est donc un même processus de délétion et de maturation de l'ARN transcrit (voir figure 23-24) qui agit pour produire l'ARNm de chaîne lourde.

Les lymphocytes T possèdent des protéines de liaison aux anticorps d'une autre sorte, appelées *récepteurs de cellules T*. Ces récepteurs sont aussi légion et leur diversité est assurée par un mécanisme de remaniement très semblable à celui qui vient d'être décrit.

C'est donc par un mécanisme de recombinaison entre segments d'ADN opérant au cours du développement des lymphocytes B, que le système immunitaire peut produire une énorme diversité de ces cellules, codant au total pour des millions d'anticorps potentiels différents. Une recombinaison spécifique permet de produire des milliers de chaînes lourdes et légères différentes. Une chaîne légère donnée peut être synthétisée dans un lymphocyte B en même temps que n'importe laquelle des chaînes lourdes concevables. Comme le site de liaison à l'antigène est formé par l'assemblage des régions variables des deux types de chaînes, ces milliers de chaînes lourdes et légères potentielles donnent lieu à des millions d'anticorps différents.

Message Deux mécanismes combinatoires - des remaniements d'ADN produisant de nombreuses chaînes lourdes et légères différentes et la construction des sites de laison aux antigènes par l'assemblage de parties de ces molécules - permettent d'obtenir des millions d'anticorps différents à partir d'un nombre réduit de gènes.

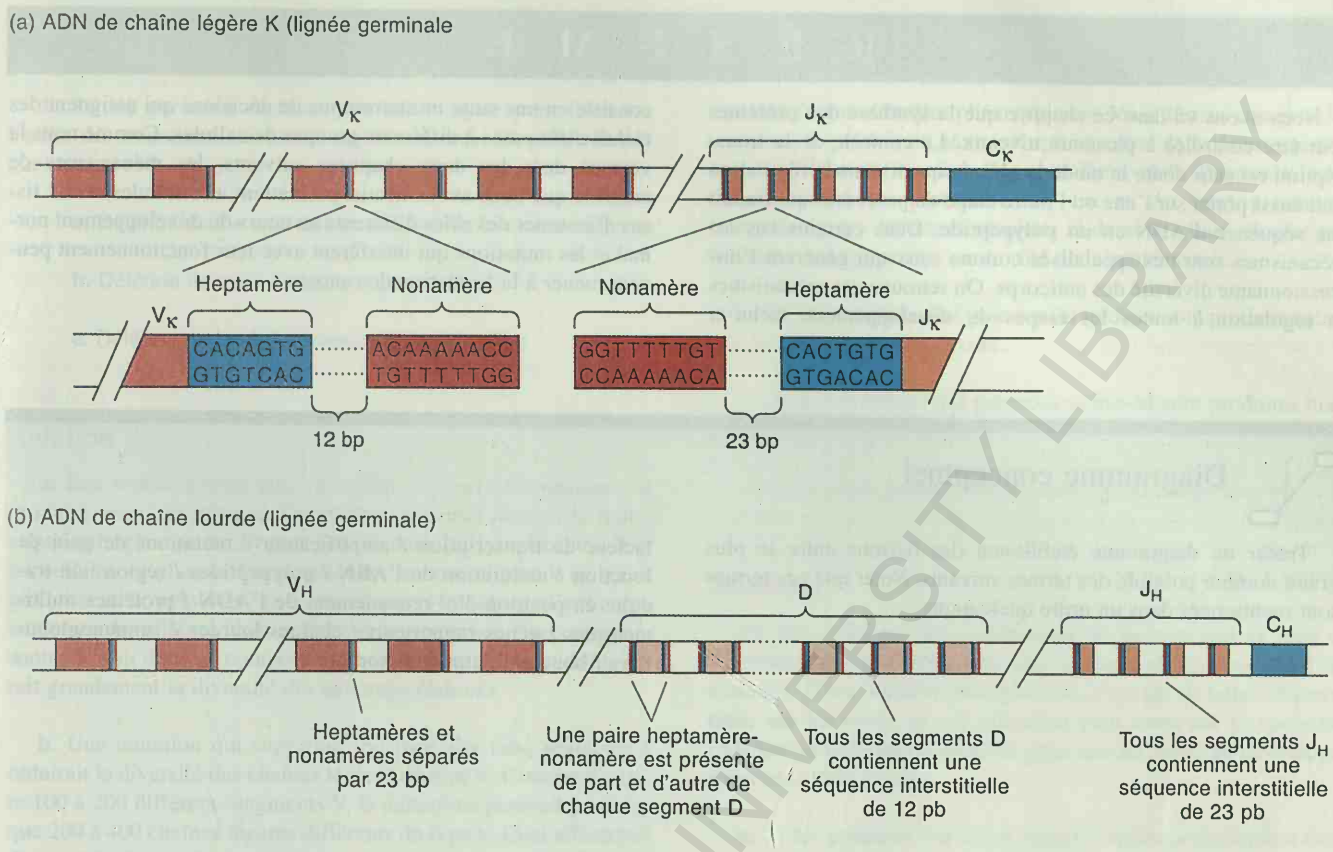


Figure 23-25. Les séquences hepta- et nonamériques qui, par leur alignement, guident les remaniements producteurs d'anticorps. (a) La ligne supérieure montre un gène de chaîne légère κ encore non remanié dans une cellule germinale. En position 3' par rapport à chaque segment variable (V) se trouve la structure de 28 pb schématisée en dessous, contenant des séquences itératives de 7 et 9 pb séparées par des sous-segments de 12 pb différant d'une structure à l'autre. En position 5' par rapport à chaque segment de jonction (J) se trouve la structure de 39 pb schématisée en dessous. Les heptamères et nonamères sont identiques aux précédents mais orientés de manière inverse et séparés par des sous-segments de 23 pb. La recombinaison ne se produit qu'entre régions contenant respectivemeent des sous-segments de 12 et de 23 pb. Un V ne peut donc se recombiner qu'avec un J : des recombinaisons V-V ou J-J ne se produisent pas. Un second gène de chaîne légère, le gène λ, subit le même genre de remaniement. (b) diagramme semblable pour les remaniements conduisant à la formation de chaînes lourdes (H). Pour obtenir un gène de chaîne lourde fonctionnel, deux recombinaisons doivent se produire : V-D et D-J. Celles-ci se produiront correctement du fait que seuls des sous-segments de 23 pb peuvent se recombiner avec des sous-segments de 12 pb. (D'après J.D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2ème éd. Copyright © 1992 par Scientific American Books).

Quel mécanisme contrôle les remaniements chromosomiques de manière à ce que l'assemblage des segments V et J s'opère avec l'exactitude et la reproductibilité nécessaires ? Les gènes de chaîne légère comportent à l'extrémité 3' de chaque segment variable une suite de 7 et de 9 paires de bases, séparées par 12 autres (voir figure 23-25). Les éléments de 7 et de 9 paires ont toujours la même séquence mais ce n'est pas le cas pour les 12 qui les séparent. En position 5' par rapport à chaque segment de liaison (J) on retrouve une structure presque identique, comportant les mêmes segments de 7 et 9 paires de bases, à ceci près qu'elles sont orientées de manière opposée et séparées par 23 paires de bases. Au cours des réarrangements, la recombinaison se produit toujours entre des segments comportant des espaces de 12 et de 23 paires de bases. On peut donc penser que la recombinaison implique la formation d'hétéroduplexes entre les régions adjacentes aux segments variables et aux segments de jonction au niveau des séquences complémentaires de 7 et 9 paires de bases. Deux protéines, codées par les gènes *RAG-1* et *RAG-2* (Gènes Activateurs de la Recombinaison, ou "recombination-activating genes") se lient probablement à ces séquences et contrôlent ainsi une étape essentielle de ce mécanisme de recombinaison spécifique.

Ce type de remaniement programmé de l'ADN est-il particulier au fonctionnement du système immunitaire ? Sans doute que non. En effet, le gène *RAG1* est également exprimé dans le cerveau, ce qui donne à penser que certaines fonctions du système nerveux, elles aussi mettent en oeuvre des remaniements de l'ADN.

RÉSUMÉ

Nous avons vu dans ce chapitre que la synthèse des protéines peut être contrôlée à plusieurs niveaux. Le contrôle de la transcription est sans doute le mode le plus fréquent mais la régulation peut aussi porter sur l'une ou l'autre étape du processus qui traduit une séquence d'ADN en un polypeptide. Dans certains cas les mécanismes sont très spécialisés comme ceux qui génèrent l'impressionnante diversité des anticorps. On retrouve ces mécanismes de régulation à toutes les étapes du développement. Celui-ci consiste en une suite ininterrompue de décisions qui assignent des tâches différentes à différents groupes de cellules. Comme nous le verrons dans les deux chapitres suivants, les mécanismes de contrôle que nous avons décrits permettent aux cellules et aux tissus d'assumer des rôles différents au cours du développement normal et les mutations qui interfèrent avec leur fonctionnement peuvent mener à la formation de cancers.

Diagramme conceptuel

Tracer un diagramme établissant des liaisons entre le plus grand nombre possible des termes suivants. Noter que ces termes sont mentionnés dans un ordre quelconque.

facteur de transcription / amplificateur / mutations de gain de fonction / maturation de l'ARN / polypeptides / région non traduite en position 3' / remaniement de l'ADN / protéines multimériques / gènes rapporteurs / chaînes lourdes d'immunoglobulines / boucle d'autorégulation

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Les étapes cruciales du développement consistent à enclencher des commutateurs principaux qui commandent des cascades programmées de mécanismes de régulation. Dans les deux exemples discutés dans ce chapitre (la détermination du sexe chez la drosophile et chez les mammifères) identifiez ces commutateurs et décrivez leurs mécanismes d'action.

Solution

a. Dans la détermination du sexe chez la drosophile, le commutateur principal concerne la régulation de transcription du gène *Sxl* au cours des premières étapes de l'embryogénèse. Les propriétés de la protéine Sxl et l'existence d'un promoteur tardif pour le gène correspondant font en sorte qu'une fois la protéine Sxl produite, une boucle autorégulatrice assure le maintien de cette production. Sxl est également responsable d'une série d'événements de maturation de l'ARN qui aboutissent à la production de l'ARNm de *dsxF*.

En l'absence de *Sxl* un processus de maturation par défaut produit l'ARNm de *dsxM*. L'événement clef est dès lors si le commutateur *Sxl* est mis en position ouvert ou fermé, ce qui est sous le contrôle des facteurs de transcription dits numérateurs. Un niveau élevé de ces facteurs, correspondant à un rapport X:A de 1.0, est requis pour activer la transcription de *Sxl* à partir de son promoteur précoce et aiguiller le développement vers la voie femelle. En l'absence de ces niveaux élevés, le développement est aiguillé par défaut vers la voie mâle.

b. Dans la détermination du sexe chez les mammifères, le commutateur principal est la présence ou l'absence du gène *SRY/Sry*, normalement situé sur le chromosome Y. En présence du produit de ce gène, une protéine se liant à l'ADN, les cellules de Leydig de la gonade se mettent à synthétiser des androgènes, ou hormones stéroïdes induisant l'androgénèse. Ces hormones sont sécrétées dans le sang et agissent sur des tissus précis pour y induire l'activité de facteur transcriptionnel qui est latente chez les récepteurs d'androgènes. Sans cette activation le développement procède par défaut dans la voie femelle. Les facteurs qui activent l'expression du gène *SRY/Sry* dans les testicules ne sont pas encore bien compris. Comme le commutateur principal est ici la présence ou l'absence du gène *SRY/Sry* lui-même, il est probable que les facteurs de régulation qui activent *SRY/Sry* sont déjà présents dans la gonade indifférenciée à un stade précoce du développement.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Si une personne se retrouvait homozygote pour l'une ou l'autre des mutations suivantes, quelles en seraient pour elle les conséquences ?

a. Délétion de l'amplificateur du gène de la chaîne légère

b. Délétion de trois des cinq segments J

c. Délétion de la région constante toute entière

Solution

a. Des remaniements chromosomiques pourraient toujours se produire mais, du fait que l'amplificateur serait absent, la transcription du gène ne serait plus activée dans les lymphocytes B et les cellules du plasma. Par conséquent, aucune chaîne κ ne serait produite et la personne ne pourrait pas synthétiser d'anticorps contenant des chaînes légères. Tout anticorps produit par cette personne devrait donc ne comporter que des chaînes λ. Ceci diminuerait grandement la diversité des anticorps élaborés.

b. Une mutation qui supprime soit trois des cinq segments J réduirait la diversité des chaînes légères de type κ. Comme il existe 100 à 200 différents segments V, le mutant ne pourrait produire que 200 à 400 chaînes légères différents du type κ. Ceci affecterait d'autant la diversité des anticorps.

c. Une mutation supprimant la région constante aurait pour effet de rendre défectifs tous les produits de remaniements affectant le gène κ. En effet elles seraient dépourvues de leurs séquences carboxyterminales et serait dès lors incapables de s'assembler en anticorps tétramériques. Ceci compromettrait fortement la capacité de l'anticorps de se lier à l'antigène.

2. Supposez que vous ayez identifié une nouvelle mutation chez *Drosophila* (appelons la *mll* pour «male-like», c'est-à dire mimétique du mâle) qui détermine les mouches de rapport X:A 1.0 à se développer en mâles phénotypiques. Vous désirez comprendre comment le produit du gène *mll* agit au cours de la détermination et de la différentation sexuelles chez *Drosophila*. Pour cela, vous déterminez si les protéines *Sxl*, *tra* et *dsx* sont présentes. Considérons les différents résultats ci-dessous ; dans chaque cas formulez une hypothèse sur le rôle de la protéine *mll*.

a. Les protéines Sxl précoces et tardives sont produites ainsi que les protéines tra et dsx-M.

b. Les protéines Sxl précoces et dsx-M sont produites mais pas de Sxl tardive ni de tra.

c. La seule protéine fonctionnelle produite est dsx-M.

Solution

En fait, c'est par des expériences de ce type que la voie de détermination et de différentiation sexuelle de la drosophile fut élucidée. D'une manière plus générale, c'est par de telles observations sur les effets qu'une mutation peut avoir sur l'expression (ARNm ou protéine) d'un autre gène que les voies du développement sont débrouillées.

a. Si les protéines Sxl et tra opèrent encore normalement dans un contexte X:A de 1.0, alors que la maturation de l'ARNm dsx produit la forme mâle de la protéine correspondante, il est probable que *mll* intervienne dans la maturation de l'ARN *dsx*.

b. Ici le bloc semble survenir entre la production de protéine *Sxl* précoce et celle de protéine *Sxl* tardive. Ceci suggère que *mll* joue un rôle dans l'autorégulation qui contrôle la maturation différentielle du produit *Sxl* tardif.

c. Dans cet exemple le bloc précède l'expression de *Sxl* dans le jeune embryon. Une explication possible est que la protéine mll contribue à la fonction numérateur dans l'interprétation du rapport X:A.

PROBLÈMES

1. L'immunohistochimie est une technique qui permet d'identifier une protéine dans les tissus d'un organisme en la rendant visible grâce à des anticorps spécifiques. Supposez que vous possédiez deux anticorps, l'un spécifique de l'extrémité carboxyterminale de la protéine Sxl et l'autre de l'extrémité aminoterminale de la même protéine.

a. Que vous attendez-vous à voir si vous colorez de très jeunes embryons par chacun de ces deux anticorps ?

b. A quoi vous attendez-vous dans le cas d'embryons plus âgés ?

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Plusieurs niveaux de régulation contribuent au contrôle de la production des anticorps par les lymphocytes B.

a. Expliquez comment les remaniements de l'ADN impliqués dans la production des anticorps et la nature multimérique des anticorps contribuent à la diversification de ces derniers.

b. Il est important que les amplificateurs impliqués dans la synthèse des anticorps soient localisés dans le voisinage du segment de gène codant pour la partie constante. Pourquoi ? Que se passerait-il si l'amplificateur était situé près du segment V le plus éloigné du segment C ?

3. Chez *Drosophila*, les individus pourvus de deux chromosomes X et de trois jeux d'autosomes (rapport X:A de 0.67) sont intersexués. Lorsqu'on les examine de près on s'aperçoit que ce phénotype reflète en fait une constitution en mosaïque. certaines cellules évoluent vers un phénotype mâle, d'autres vers un phénotype femelle. Expliquez celà en vous référant au fonctionnement du commutateur *Sxl*.

4. Le trangène {Δ 2,3} produit de la transposase P active dans les cellules somatiques aussi bien que germinales. Supposez que nous voulions développer une technique permettant d'induire l'excision de P dans un tissu seulement, par exemple l'aile en cours de développement. Proposer une stratégie en vous basant sur les informations présentées dans ce chapitre.

5. Pour que le système immunitaire des vertébrés soit efficace, il doit pouvoir générer une grande diversité d'anticorps. De plus, les cellules qui produisent un anticorps reconnaissant un antigène présent à un moment donné doivent pouvoir proliférer rapidement (ce qui s'appelle *l'expansion clonale*) de telle sorte qu'assez d'anticorps soient disponibles pour vaincre une infection.

a. Dès qu'un gène de chaîne légère a été remanié dans un lymphocyte B, aucun remaniement de gènes de cette sorte ne se produit plus dans cette cellule. Il en est de même pour les gènes de chaînes lourdes. Ce phénomène a reçu le nom *d'exclusion allélique*. Pourquoi ce phénomène joue-t-il un rôle clef dans la réponse immunitaire ?

b. On estime que la souris possède 300 segments variables et 4 segments de jonction pour les gènes de chaînes légères, et 1000 segments variables, 4 de jonction et 12 de diversité pour les chaînes lourdes. Si tous les remaniements de chaînes lourdes et légères se produisaient strictement au hasard, combien d'anticorps différents le système immunitaire pourrait-il produire ?

6. Des mutations de gain de fonction telles que *Tab* peuvent réverter vers l'allèle sauvage à haute fréquence sous l'action d'un mutagène. Expliquez cette observation.

7. La transposase de l'élément P de la drosophile est codé par 4 exons (0,1,2 et 3). Le transcrit correspondant des cellules germinales est long de 2,1kb, contient ces 4 exons et code pour une transposase active. Par contre, le transcrit somatique, qui est long de 2,-kb, contient les 4 exons et en outre n'excise pas l'intron situé entre les exons 2 et 3.

a. L'ARNm somatique, plus long, code pour une protéine dont la taille est seulement les trois quarts de celle de la protéine codée par le transcrit germinal. Comment un transcrit plus long peut-il coder pour une protéine plus courte ?

b. La transcriptase inverse est une enzyme qui produit une copie bicaténaire d'ADN à partir d'un ARNm. Cette copie est appelée cDNA (voyez-en la description au chapitre 14). Comment pourriez-vous tirer parti de cDNAs et de transgènes pour obtenir une mouche où la transposition se produise dans les cellules somatiques ?

c. Supposons que vous traitiez l'élément P par l'enzyme de restriction *SalI* et que vous en obteniez huit fragments. Vous faites un Southern de ces fragments en prenant pour sonde du cDNA radioactif de la transposase de cellules germinales. Vous observez que les huit fragments s'hybrident à la sonde. Qu'en concluez-vous en ce qui concerne les positions respectives des sites reconnus par l'enzyme *SalI* ?

8. Vous étudiez un gène de souris qui s'exprime dans les reins des souris mâles. Vous avez cloné ce gène et vous voulez identifier les segments d'ADN qui correspondent respectivement aux spécificités tissulaire et sexuelle de ce gène. Comment vous y prendriez-vous ?

9. Chez *Drosophila*, les individus XX qui sont aussi homozygotes pour des mutations dans le gène *tra* ont des caractères sexuels secondaires de type mâle. Chez *Drosophila* les gonades se forment à partir de tissu mésodermal somatique et de cellules de la lignée germinale. Ces homozygotes XX ; *tra* sont stériles et ne possèdent que des gonades rudimentaires. Vous soupçonnez que cette stérilité est due au fait que le tissu somatique soit sexuellement transformé en tissu mâle par le gène *tra* mais que les cellules germinales restent femelles. Concevez une expérience qui mette ce raisonnement à l'épreuve.

10. Les personnes XYY sont des mâles fertiles alors que les XXX sont de sexes féminin et fertiles. Qu'est-ce que ces observations nous révèlent au sujet des mécanismes de la détermination sexuelle et de la compensation par effet de dose ?

11. On observe parfois des personnes qui sont des mosaïques de tissus XX et XY. Leur phénotype sexuel est généralement uniforme. Certaines sont phénotypiquement du sexe féminin, d'autres du sexe mâle. Expliquez ces observations en vous référant au mécanisme de la détermination sexuelle chez les mammifères.

12. Il existe des mutations dominantes du gène *Sxl* (les allèles Sxl^M) qui font d'animaux XY des femelles mais n'affectent pas les XX. Il est possible d'induire des réversions de ces allèles Sxl^M par des agents mutagènes. Ces réversions, appelées Sxl^f donnent des individus normaux dans un contexte XY mais transforment des XX en mâles phénotypiques. Expliquez ces observations tout en gardant à l'esprit que dans la situation normale *Sxl* n'est pas nécessaire au développement mâle.

CHAPITRE

24

La génétique et la différenciation cellulaire

Le fuseau mitotique d'une cellule de crapaud (*Xenopus laevis*) en métaphase. En vert, les fibres du fuseau composées d'éléments du cytosquelette appelés microtubules et, en rouge, la position d'une protéine moteur appelée *kinésine* qui se déplace le long des microtubules en entraînant avec elle un chargement de constituants cellulaires. La kinésine est supposée tirer les chromosomes le long des fibres du fuseau en direction des pôles au cours de l'anaphase de la mitose. (Reproduit d'après I. Vernos, J. Raats, T. Hirano, J. Heasman, E. Karsenti et C. Wylie. *Cell* 81, 1995, 120.)

CONCEPTS-CLÉS

- Le cytosquelette constitue un support structural et un système de crémaillères pour le mouvement des matériaux à l'intérieur de la cellule.
- La prolifération normale des cellules est modulée par la régulation du cycle cellulaire.
- Des systèmes de signalisation réalisent la coordination des mécanismes régulateurs qui affectent les différents tissus et cellules.
- Dans un cancer, les cellules prolifèrent de manière incontrôlée à la suite de mutations successives dans la même cellule somatique.
- La plupart des gènes dont les mutations sont à l'origine de cancers sont responsables de la production de composants cellulaires importants qui contribuent directement ou indirectement au contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire.

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

Ce sont les nombreux types de cellules différenciées du corps qui permettent aux divers organes et tissus de jouer leurs rôles physiologiques spécifiques. Des cellules isolées peuvent être très petites ou présenter de longs appendices. Elles peuvent être rondes, cylindriques ou très étirées et présenter des appendices allongés, voire ramifiés. Le corps humain comporte des centaines, voire des milliers de types cellulaires différents. Certaines cellules sont destinées à ne jamais se diviser, d'autres à se diviser rapidement, d'autres encore à ne se diviser que dans des circonstances particulières et hautement controlées. De nombreuses recherches en biologie cellulaire visent à comprendre comment les cellules acquièrent et conservent leurs structures et leurs fonctions particulières, et comment ces processus peuvent se détériorer. Au cours de ces dernières années, l'approche génétique a produit des outils nouveaux permettant de comprendre et d'analyser la biologie des cellules normales ou malades. Nous aborderons particulièrement l'étude du cancer qui est clairement reconnu comme une maladie génétique des cellules somatiques. Nous ne pourrons comprendre les bases biologiques du cancer qu'en nous intéressant à la biologie cellulaire de la différenciation et à la génétique des cellules somatiques. Dans ce chapitre nous explorerons certaines des découvertes de la génétique et de la biologie cellulaire et examinerons la manière dont elles affectent notre compréhension du cancer. En outre, comme nous le verrons au chapitre 25, certains des processus cellulaires qui seront discutés ici contribuent de manière essentielle aux mécanismes impliqués dans l'établissement de schémas biologiques complexes.

Nous envisagerons trois aspects importants de la biologie des cellules normales : le cytosquelette, le cycle cellulaire et la communication intercellulaire. Le cytosquelette consiste en un système de fibres qui maintiennent la forme de la cellule et le long desquels des matériaux sont déplacés d'une région de la cellule à une autre. Le cycle cellulaire est constitué par les mécanismes qui gouvernent la progression de la division cellulaire et de l'interphase. La communication intercellulaire est le processus par lequel les informations chimiques et les ordres sont transmis d'une cellule à une autre.

Tout en traitant ces sujets séparément, nous devrons néanmoins rester conscients qu'ils sont étroitement liés. Le fuseau qui fait se mouvoir les chromosomes en direction des pôles au cours de l'anaphase est composé d'éléments du cytosquelette appelés les **microtubules**, tandis que la position du sillon de division est déterminée par d'autres éléments structuraux appelés les **microfilaments**. Le minutage de la division mitotique et de la capacité de la cellule à entamer la mitose dépendent du contrôle du cycle cellulaire. En général, le nombre de cellules d'un tissu est étroitement contrôlé par des processus de communication intercellulaire qui favorisent ou répriment la progression du cycle cellulaire vers la mitose.

Tous ces aspects de la biologie cellulaire interviennent dans la biologie du cancer. Les mécanismes qui régissent normalement le cycle cellulaire et le soumettent à des signaux de prolifération appropriés de la part d'autres cellules sont abolis dans les cellules cancéreuses. Divers aspects du comportement des cellules normales, y compris le contrôle de la forme et la capacité de se déplacer, sont modifiés dans la cellule cancéreuse. Dans la deuxième moitié de ce chapitre, nous examinerons la façon dont les mutations qui déclenchent des cancers altèrent la régulation normale de la cellule. Nous nous concentrerons particulièrement sur les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et sur la communication intercellulaire où la relation avec le cancer est particulièrement bien comprise.

Le cytosquelette et l'architecture cellulaire

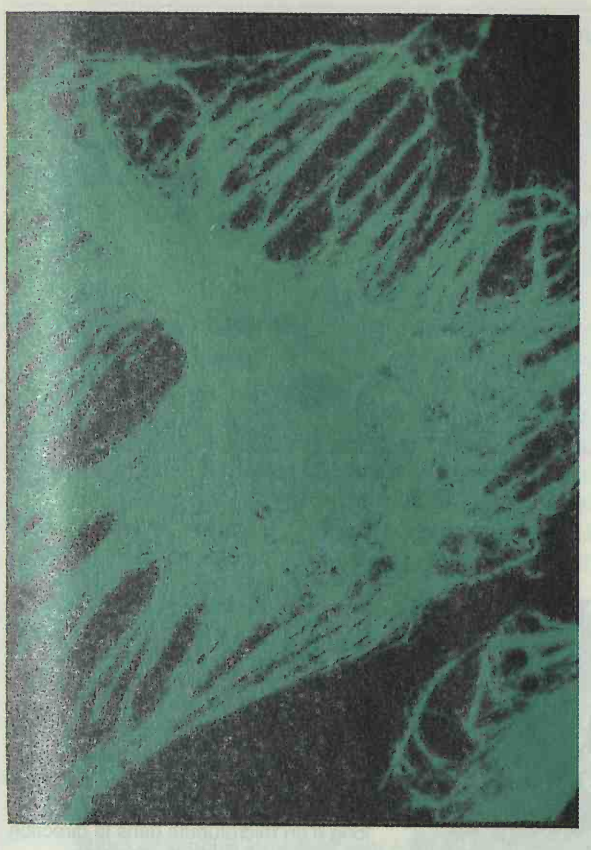
Une étude plus détaillée des cellules a mis en évidence des niveaux de structure et d'organisation que l'on ignorait auparavant. Lorsque les chercheurs observèrent pour la première fois des cellules à l'aide de microscopes rudimentaires, ils crurent voir des sacs remplis d'une substance liquide plus ou moins uniforme, le «protoplasme». Avec des microscopes offrant une meilleure résolution, la distinction entre le noyau et le cytoplasme devint apparente. Lorsque le pouvoir de résolution fut encore meilleur, divers organites purent être identifiés. Et on considère aujourd'hui les cellules comme des entités hautement compartimentées où divers organites ou composants structuraux jouent des rôles spécifiques.

Parmi ces composants structuraux, nous savons maintenant que plusieurs classes de protéines forment les réseaux de fibres qui constituent la superstructure d'une cellule. Cette superstructure, le cytosquelette, détermine la forme et les propriétés mécaniques de la cellule, et constitue le réseau des voies utilisées pour guider le transport des matériaux cellulaires

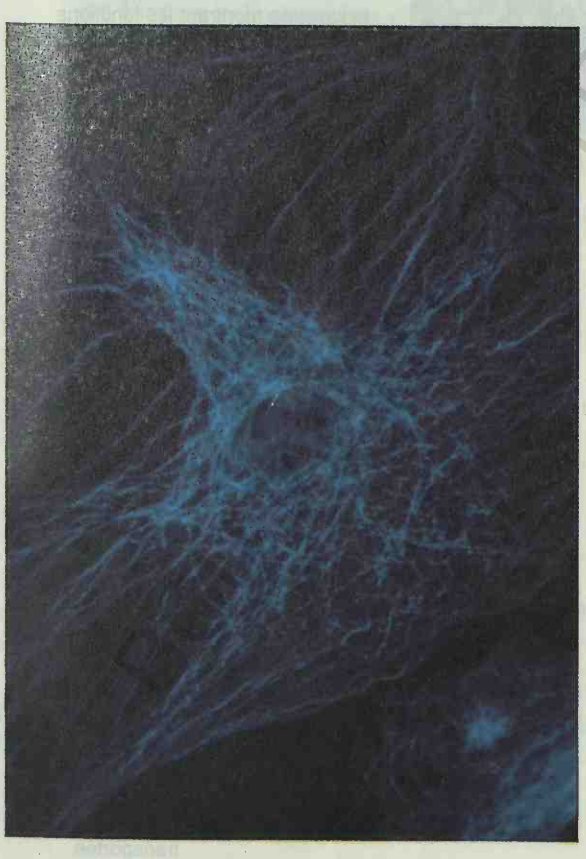
Nous avons plusieurs raisons de nous intéresser au cytosquelette. Tout d'abord, il constitue l'appareil responsable du partage du matériel chromosomique entre les pôles au cours de la mitose et de la méiose. La localisation et l'orientation du plan de clivage est également contrôlée par le cytosquelette, offrant à celui-ci la possibilité de déterminer les spécialisations de divisions particulières des cellules somatiques. En déterminant la forme d'une cellule ainsi que son aptitude à migrer, des rôles différenciés peuvent être attribués aux cellules et modulés. Des changements coordonnés de la forme des cellules peuvent conduire à la formation de protubérances ou de renfoncements des couches de tissus qui, à l'extrême, peuvent se traduire par la formation d'appendices ou l'internalisation de couches de cellules au cours des mouvements morphogénétiques caractéristiques de l'embryogénèse précoce et de la formation des organes. Enfin, bien que les évènements moléculaires ne soient pas très bien connus, il est clair que les changements de forme ou de mobilité des cellules jouent un rôle important dans la formation et la croissance des tumeurs.

Le cytosquelette consiste en plusieurs réseaux de fibres structurales qui existent dans chaque cellule : **microfilaments**, **filaments intermédiaires** et **microtubules** (figure 24-1 et tableau 24-1). Chacun possède son architecture propre, avec un jeu unique de protéines de structure, de protéines de pontage qui connectent les fibres individuelles entre elles et de protéines qui favorisent l'assemblage ou le désassemblage des fibres. Bien que toutes leurs fonctions ne soient pas encore connues, il est certain que chacun des systèmes de cytosquelette fournit une contribution différente à la cellule.

(a) Filaments intermédiaires (vimentine)



(b) Microtubules (tubuline)



(c) Microfilaments (actine)

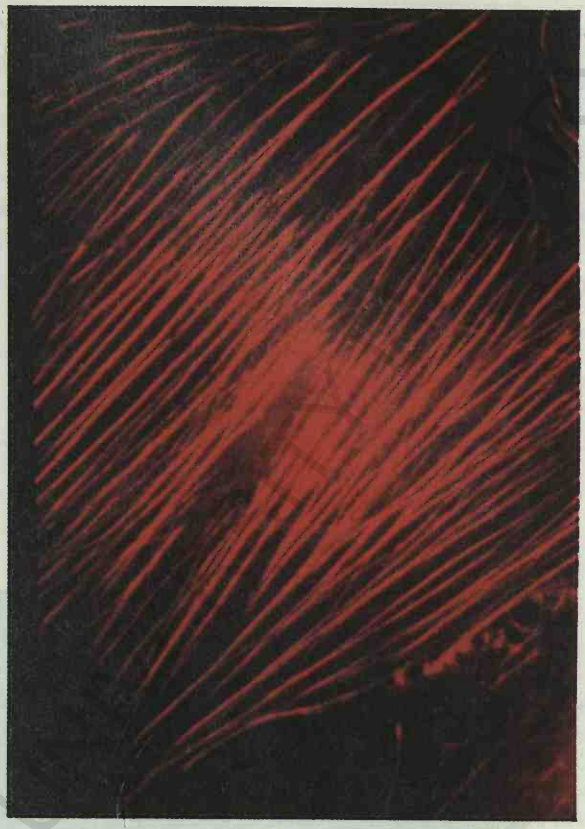


Figure 24-1. Les différents systèmes cytosquelettiques d'une même cellule. Les distributions de (a) la vimentine, protéine de filament intermédiaire, de (b) la tubuline, protéine de microtubule et de (c) l'actine, protéine de microfilament, sont représentées. (Photographie aimablement fournie par V. Small. Reproduit d'après H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

La forme de la cellule

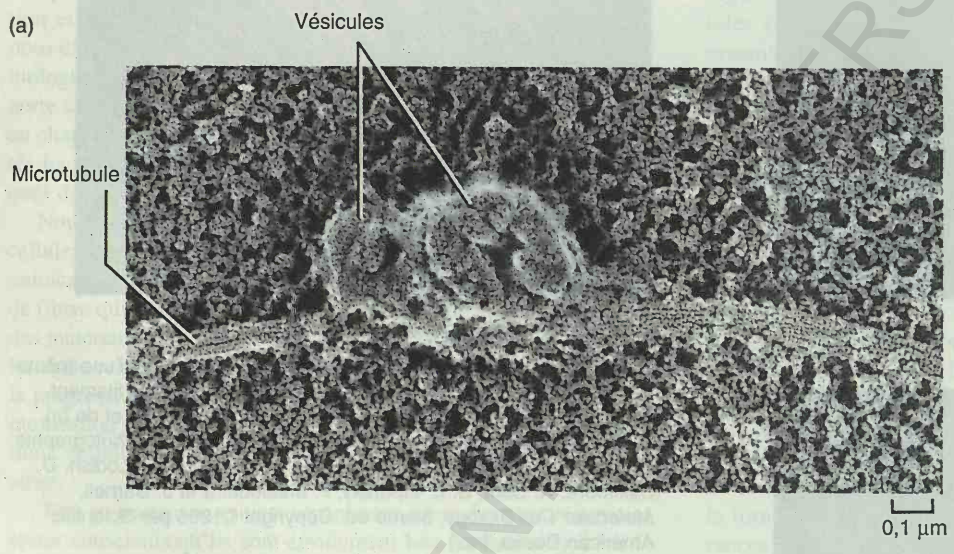
Les trois types de fibres de support contribuent probablement à la forme d'une cellule. Les protéines de la membrane plasmique de la cellule peuvent se lier à d'autres protéines dans le cytoplasme. A leur tour, ces autres protéines peuvent s'attacher à des protéines qui se fixent et réalisent un pontage entre les éléments cytosquelettiques. De cette manière, la membrane plasmique est attachée au cytosquelette dont l'organisation va déterminer le contour de la cellule.

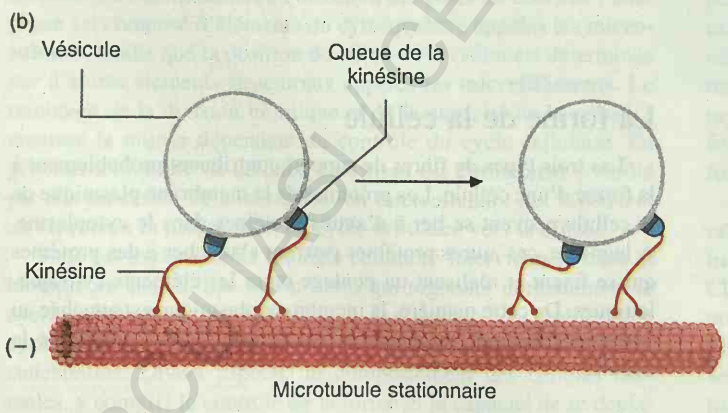
Le transport intracellulaire

Les microfilaments et les microtubules servent aussi de voies pour le mouvement dirigé des molécules et des organites dans la cellule (figure 24-2). Les microfilaments et les microtubules possèdent une polarité (conceptuellement similaire à celle de la polarité de 5' vers 3' de l'ADN et de l'ARN, même si la base molécu-

Tableau 24-1. Quelques propriétés des différents systèmes cytosquelettiques

Système cytosquelettique	Diamètre des fibres	Protéines de structure	Protéines moteurs	Rôles dans la cellule
Microfilaments	7-9 nm	Actine	Myosine	Microvillosités Polarité cellulaire Mouvement amiboïde Sillon de division mitotique
Filaments intermédiaires	10 nm	Vimentine, kératine, desmine, lamine	—	Support structural
Microtubules	24 nm	Tubuline	Kinésine, dynéine	Motilité Transport de vésicules Transport des protéines Cils et flagelles Fuseau mitotique





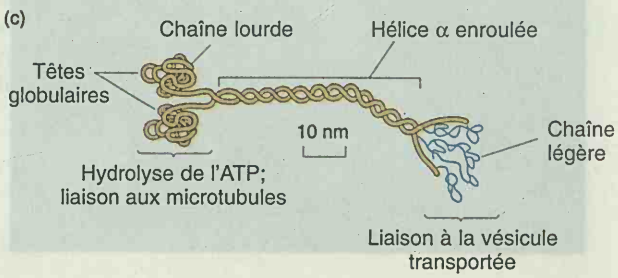


Figure 24-2. Mouvement des vésicules le long des microtubules. (a) Photographie au microscope électronique à balayage de deux petites vésicules attachées à un microtubule. (b) Un diagramme montrant comment la kinésine est supposée attacher à sa queue des chargements cellulaires tels que des vésicules et les déplacer le long d'un microtubule dans la direction de + vers – à l'aide du domaine moteur de sa tête. (c) Un schéma de la kinésine montrant les fonctions associées aux diverses parties de la molécule protéique. (Partie a de B. J. Schnapp et al., *Cell* 40, 1985, 455. Présentée grâce à l'amabilité de B. J. Schnapp, R. D. Valle, M. P. Sheetz et T. S. Reese. Toutes les parties reproduites d'après H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

laire de cette polarité est très différente) (figure 24-3). De plus, la polarité des éléments du cytosquelette peut être constante pour une cellule donnée. Considérons les microtubules. Il existe un endroit près du centre de la cellule où on trouve toutes les extrémités – (moins) des microtubules (figure 24-4). On l'appelle le **centre organisateur des microtubules** (**MTOC** pour microtubule organizing center). Les extrémités + (plus) sont localisées à la périphérie de la cellule. Un peu comme une automobile utilise la combustion de l'essence pour créer de l'énergie qui est ensuite transformée en mouvement, des protéines «moteurs» hydrolysent l'ATP pour produire de l'énergie qui est convertie en force pour le mouvement le long d'un microtubule. Par exemple, une protéine comme la *kinésine* peut se mouvoir dans la direction de – vers + le long des microtubules, en transportant un «chargement» tel que des vésicules (voir la figure 24-2b). Le moteur, c'est-à-dire la partie de la kinésine qui interagit directement avec la fibre du microtubule, est contenu dans la tête globulaire de la protéine (voir la figure 24-2c). Le chargement est probablement attaché à la queue de la kinésine. Les chargements peuvent être des molécules individuelles, des organites ou d'autres particules subcellulaires qui doivent être remorquées d'une région de la cellule à une autre.

Message Le cytosquelette sert à la fois de support structural pour la cellule et de réseau de voies qui guident le mouvement dirigé des particules subcellulaires et les organites.

Quel est l'avantage pour la cellule d'avoir de multiples systèmes cytosquelettiques indépendants ? Posséder plusieurs systèmes de support structural peut être important pour le maintien de l'intégrité structurale de la cellule. Certains composés ont la capacité d'induire le désassemblage d'éléments cytosquelettiques spécifiques (par exemple, la cytochalasine, un produit naturel d'origine végétale, induit la dépolymérisation des microfilaments). La cellule peut survivre à de tels dommages aussi longtemps que les autres systèmes restent en place pour maintenir au moins partiellement la structure générale de la cellule. Un autre avantage concerne vraisemblablement la division du travail. Avec des systèmes cytosquelettiques multiples, un chargement peut être transporté vers n'importe quel endroit de la cellule.

Le cytosquelette et la division cellulaire

Nous pouvons apprécier combien la génétique et les mécanismes du développement dépendent du cytosquelette en examinant le processus de la division cellulaire. Au cours de la mitose, les chromosomes doivent être équitablement répartis entre les deux cellules filles. La machinerie cellulaire qui remplit cette tâche est un des systèmes cytosquelettiques : les microtubules. Un autre aspect de la mitose est la cytocinèse, le processus par lequel les autres composants subcellulaires sont distribués dans les cellules filles. Selon le type de cellule qui subit la mitose, la cytocinèse peut partager plus ou moins équitablement les composants cellulaires de manière à produire deux cellules filles équivalentes ou les répartir de façon asymétrique pour produire des cellules filles de types différents. Le processus de cytocinèse dépend de l'action d'un autre système cytosquelettique : les microfilaments.

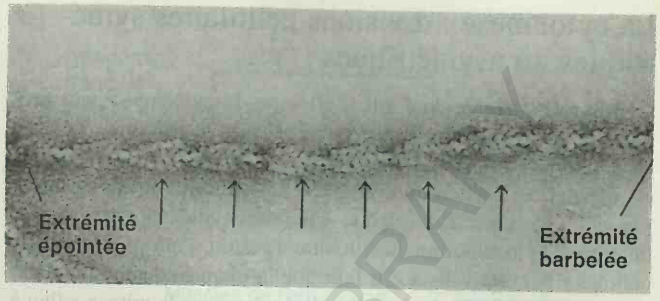


Figure 24-3. La polarité des sous-unités dans un microfilament d'actine. Un microfilament d'actine n'a pas ordinairement cet aspect mais il a été recouvert d'une protéine qui s'y lie de manière telle qu'elle révèle la polarité sous-jacente du microfilament. (Présenté grâce à l'amabilité de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

Le fuseau mitotique

Un aspect du processus de division qui est contrôlé par le système cytosquelettique est le fuseau mitotique responsable de la séparation correcte des chromosomes à l'anaphase de la mitose et de la méiose. Les fibres du fuseau, dont certaines connectent entre eux les pôles du fuseau et d'autres connectent les centromères et les pôles, sont des assemblages de microtubules. Le long de ces fibres, les protéines moteurs associées aux microtubules tirent, croit-on, leurs charges de chromosomes vers les pôles au cours de l'anaphase. En effet, on a identifié chez *Drosophila*, grâce à des allèles mutés défectifs pour la ségrégation méiotique des chromosomes, deux gènes, *ncd* et *nod*, qui codent pour des protéines moteurs ressemblant à la kinésine. Ce sont les premiers exemples concrets de la manière dont des moteurs polarisés pourraient contribuer à la ségrégation des chromosomes.

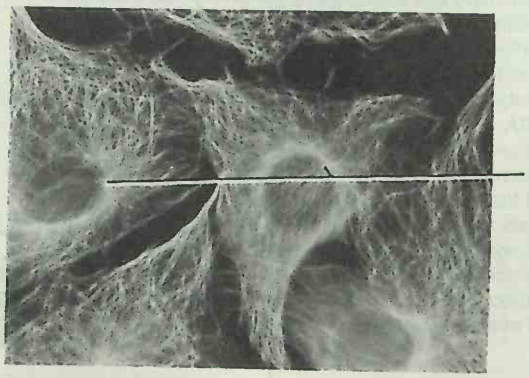


Figure 24-4. Microphotographie en fluorescence montrant la distribution de la tubuline au cours de l'interphase d'un fibroblaste animal. Notez que les microtubules rayonnent à partir d'un centre organisateur des microtubules (MOTC). Les extrémités – des microtubules sont au centre et les extrémités + sont à la périphérie de la cellule. (Présenté grâce à l'amabilité de M. Osborn. Reproduit d'après H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

La cytocinèse : divisions cellulaires symétriques ou asymétriques

Selon la manière dont elle s'effectue, la cytocinèse peut produire des cellules filles de types équivalents ou différents. Le type de division cellulaire qui se produit — symétrique ou asymétrique — dépend de l'action du cytosquelette qui détermine à la métaphase la position de la plaque équatoriale, laquelle à son tour détermine la localisation du sillon de division. Pour produire deux cellules filles équivalentes, il faut que la plaque équatoriale occupe une position centrale dans la cellule. Lorsque la mitose a lieu à cette position médiane, une distribution égale des composants cellulaires entre les deux cellules filles se produit. Toutefois, il est souvent important au cours du développement de partager le contenu d'une cellule de manière asymétrique afin que les cellules filles reçoivent des quantités différentes de certaines molécules régulatrices clés et adoptent des rôles différents au cours de ce développement. Une manière de réaliser cette distribution différentielle du contenu cellulaire consiste à placer la plaque équatoriale à une position décentrée qui conduit à son tour à une position asymétrique du sillon de division.

Cette localisation asymétrique de la plaque équatoriale à la métaphase est typique des divisions des **cellules initiales** non différenciées. Par exemple, une cellule initiale se divise asymétriquement en donnant une cellule fille (habituellement la plus grande) qui est également une cellule initiale et une autre qui est une cellule spécialisée subissant une différenciation. Par de telles divisions, une cellule peut perpétuer son propre type cellulaire tout en produisant de nombreuses cellules différenciées.

La première division cellulaire du zygote du nématode *C. elegans* fournit un exemple de division asymétrique. Une propriété intéressante de *C. elegans* en tant que système expérimental est que le mode de division cellulaire reste le même d'un ver à un autre et que les divisions peuvent aisément être suivies au microscope. Une généalogie retraçant la descendance de chacune des quelque mille cellules somatiques d'un ver peut ensuite être construite. Une partie de cette généalogie est montrée dans la figure 24-5.

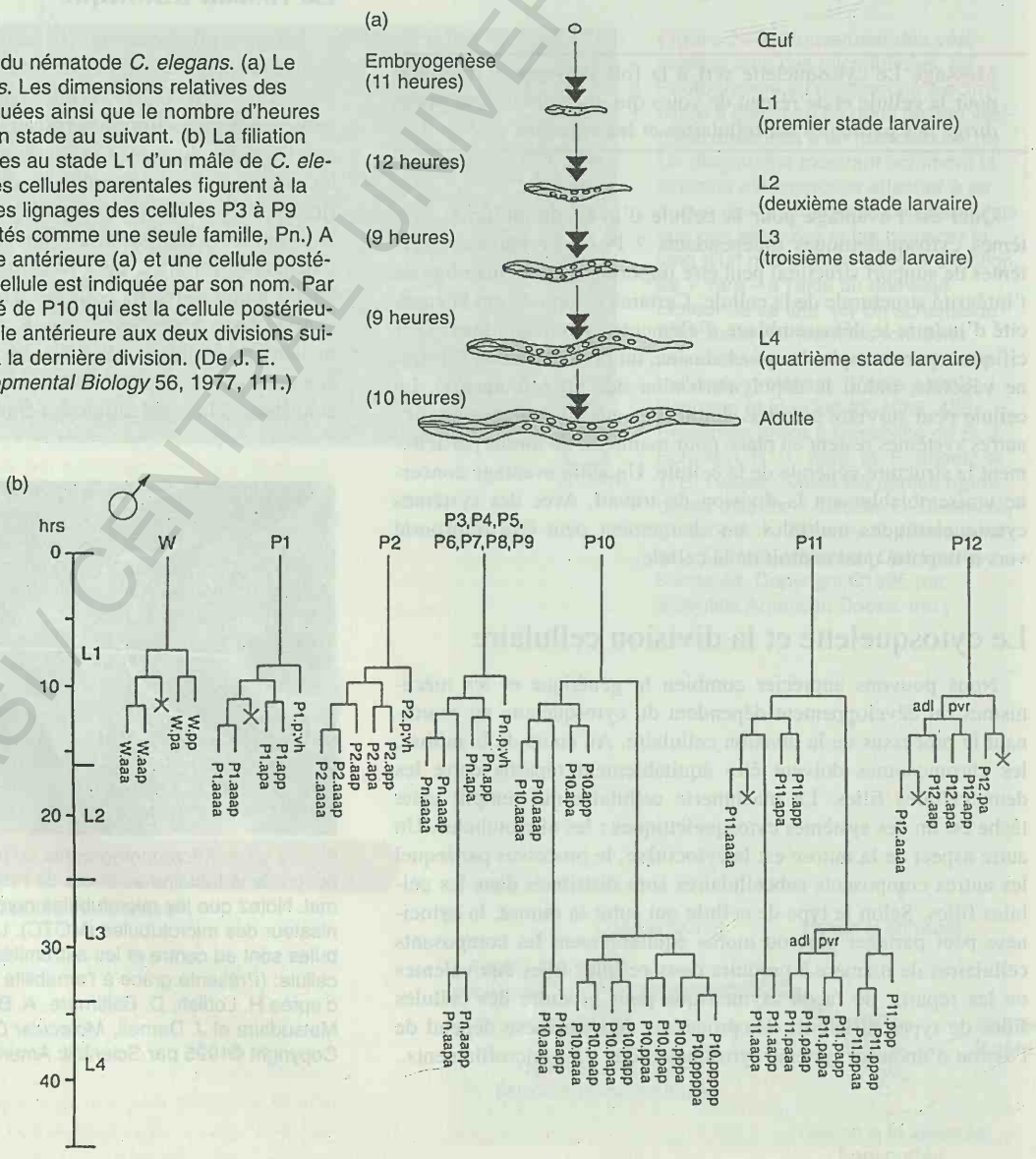


Figure 24-5. Le développement du nématode *C. elegans*. (a) Le cycle reproducteur de *C. elegans*. Les dimensions relatives des larves à chaque stade sont indiquées ainsi que le nombre d'heures nécessaires pour progresser d'un stade au suivant. (b) La filiation de 13 lignées cellulaires présentes au stade L1 d'un mâle de *C. elegans*. Les symboles identifiant les cellules parentales figurent à la rangée supérieure. (Notez que les lignages des cellules P3 à P9 sont identiques et sont représentés comme une seule famille, Pn.) A chaque division, il y a une cellule antérieure (a) et une cellule postérieure (p). L'histoire de chaque cellule est indiquée par son nom. Par exemple, P10.paap est un dérivé de P10 qui est la cellule postérieure à la première division, la cellule antérieure aux deux divisions suivantes et la cellule postérieure à la dernière division. (De J. E. Sulston et H. R. Horwitz, *Developmental Biology* 56, 1977, 111.)

BCU IASI / CENTRALA UNIVERSIT

Le zygote formé lors de la fertilisation de *C. elegans* est appelé la cellule P_0. Il se divise asymétriquement en travers de l'axe long de la cellule ellipsoïdale P_0 pour produire une grande cellule antérieure AB et une petite cellule postérieure P_1 (figure 24-6). Cette division est importante parce qu'elle fixe déjà les rôles spécialisés des descendants de ces deux premières cellules. Les descendants de la cellule AB produiront la plupart des cellules de la peau du ver (l'hypoderme) et la plupart des neurones du système nerveux, tandis que la plupart des muscles et tout le système digestif ainsi que les cellules de la lignée germinale proviendront de la cellule P_1 (figure 24-6a.) La destinée des cellules germinales dans cette division et dans les divisions futures semble corrélée avec la distribution de certaines particules fluorescentes appelées les granules P. Ces granules sont incorporés uniquement dans la cellule P_1 à la première division. Lorsque la cellule P_1 se divise, également asymétriquement, les granules P sont incorporés dans la cellule descendante P_2, et de façon similaire dans la cellule P_3 et ainsi de suite. Seule la cellule P_x qui possède les granules P donne naissance à la lignée germinale du ver. Plus tard au cours du développement, une fois que la lignée germinale est établie, cette cellule donnera naissance à de nombreuses cellules germinales dont la maturation fournira les ovocytes et les gamètes mâles.

Comment les divisions asymétriques des cellules P sont-elles contrôlées ? Il s'est avéré que les microfilaments sont impliqués. Lorsqu'elles sont appliquées au bon moment aux cellules P_0, des molécules comme la cytochalasine, qui interrompt la polymérisation des chaînes d'actine et la formation des microfilaments, rendent la première division symétrique. Une autre conséquence est que les granules P sont distribués également entre les cellules filles et que les cellules de l'embryon en cours de développement acquièrent les rôles typiques des cellules somatiques produites par la lignée P_1. Il n'est donc pas étonnant que ces embryons forment des masses de cellules qui n'ont aucune ressemblance avec un ver normal et meurent. Les effets de la cytochalasine peuvent être reproduits par la mutation *par* (*par*tition défective) qui agit au niveau de l'ovaire en produisant des embryons chez lesquels la première division de la cellule P_0 est symétrique (figure 24-6b). Les gènes *par* codent probablement pour des produits qui contribuent à des structures cytosquelettiques spéciales ou pour des fonctions qui rendent la division asymétrique.

Message Par l'attachement de particules spécifiques au cytosquelette, les divisions cellulaires peuvent être asymétriques et donner naissance à deux types de cellules filles.

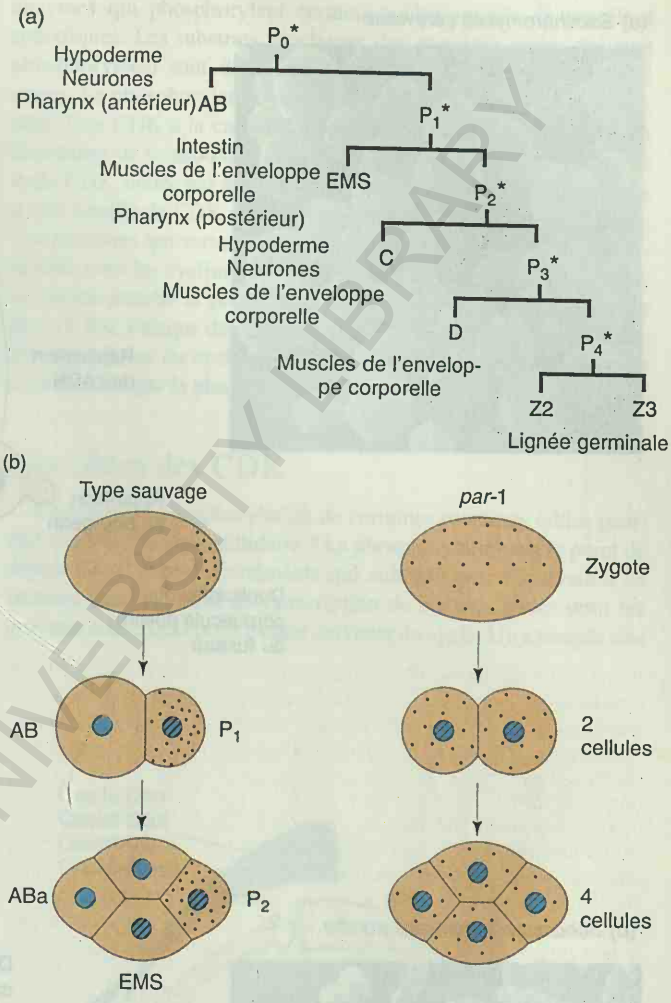


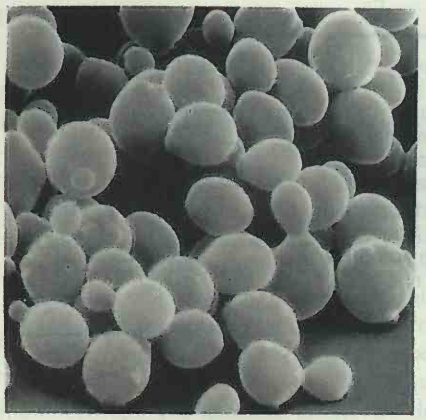
Figure 24-6. Le développement précoce de *C. elegans*. (a) Les divisions des lignages précoces du zygote. Les types cellulaires matures issus des différentes cellules filles des premières divisions sont indiqués. Notez que la lignée germinale toute entière provient de la cellule P_4. Chacune des divisions des cellules «P» indiquée par un astérisque est asymétrique et chaque cellule fille postérieure hérite de tous les granules P que l'on croit être les déterminants des lignées germinales du ver. Les lettres, (par exemple, AB, EMS) sont des symboles pour les noms des cellules filles. (b) Les deux premières divisions cellulaires des zygotes dérivés des mères de type sauvage et de type mutant *par*. Les pointillés indiquent la distribution des granules P à chaque division des embryons de type sauvage et de type mutant. Notez que, chez le type sauvage, chacune des quatre cellules produites après la seconde division mitotique est différente tandis que chez le mutant *par*, les quatre cellules ne peuvent pas être distinguées les unes des autres. (D'après S. Guo et K. J. Kemphues, *Cell* 81, 1995, 612.)

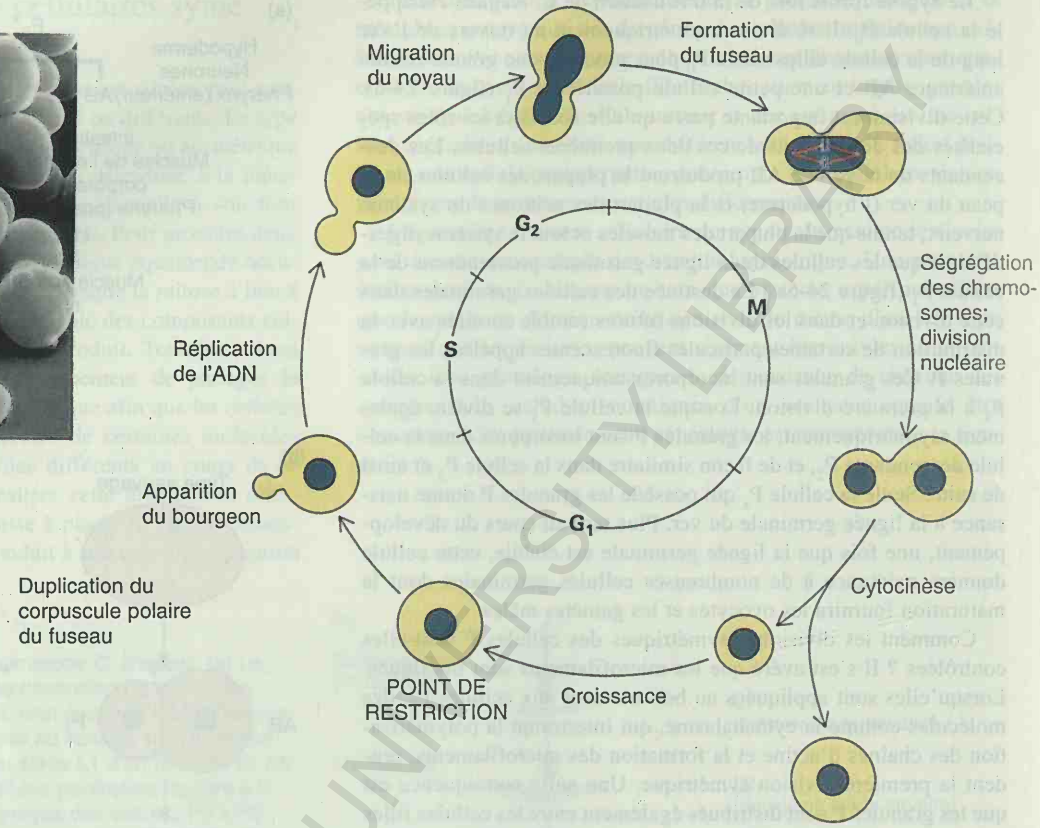
Le cycle cellulaire

Les cellules eucaryotiques qui se divisent mitotiquement suivent un cycle comportant l'interphase et la mitose. Mais ce cycle n'est pas un programme rigide qui impose un rythme fixe. Au contraire, chez les eucaryotes complexes, il progresse à une vitesse caractéristique de chaque type de cellules et spécifique des conditions environnementales. Chez les organismes matures, les vitesses de division cellulaire de nombreux tissus doivent être régulées de manière à ce qu'il y ait suffisamment de nouvelles cellules pour remplacer celles qui meurent, mais sans que des cellules ne soient produites en excès.

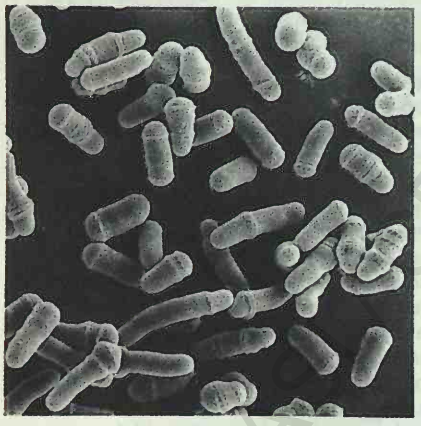
Comme nous l'avons vu au chapitre 11 (figure 11-35), le cycle cellulaire comporte quatre parties principales : la phase M — la mitose, le processus de division cellulaire décrit en détail au chapitre 3 — et trois phases qui sont des étapes de l'interphase. Ce sont : G_1, une période d'*attente* entre la fin de la mitose et le début de la réplication de l'ADN ; S_1, la période pendant laquelle a lieu la *synthèse* de l'ADN ; et G_2, la période d'*attente* qui suit la réplication de l'ADN et précède le début de la prophase mitotique. Chez les mammifères, où le cycle cellulaire a été particulièrement bien étudié, les différences de vitesse de la division cellulaire sont essentiellement la conséquence du temps passé par la cellule en phase G_1. Ceci dépend de l'existence de la phase optionnelle de

(a) *Saccharomyces cerevisiae*





(b) *Schizosaccharomyces pombe*



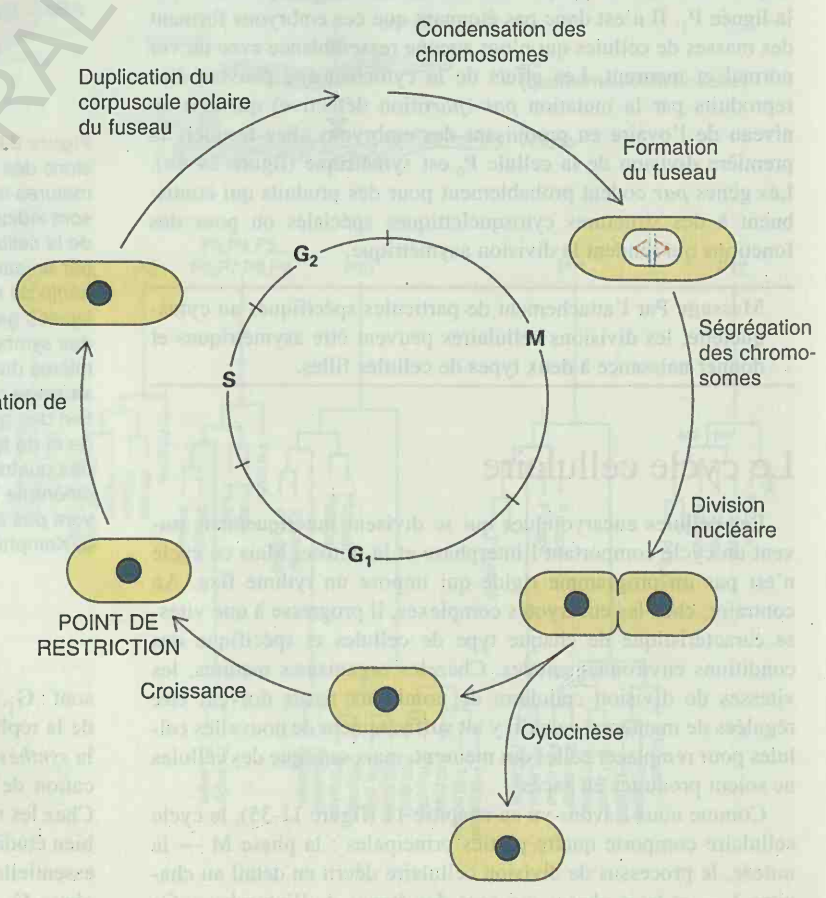


Figure 24-7. Les cycles cellulaires de deux levures. (a) La levure à reproduction par bourgeonnement *Saccharomyces cerevisiae.* (b) La levure à reproduction par fission *Schizosaccharomyces pombe.* Les photographies au microscope électronique à balayage montrent des cellules à différents stades du cycle cellulaire comme l'indiquent en (a) les différences de taille des bourgeons et en (b) les différences de longueur des cellules. Les principaux événements du cycle sont montrés. (Partie a présentée grâce à l'amabilité de E. Schachtbach et I. Herskowitz, la partie b grâce à l'amabilité de N. Hajibagheri. Reproduit d'après H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

HACENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

repos G_0 vers laquelle les cellules en phase G1 peuvent être détournées et rester pendant des temps variables selon le type de cellule et les conditions environnementales.

De nombreux aspects du cycle cellulaire semblent respecter un horaire immuable. Comment cet horaire est-il respecté ? Il serait suicidaire pour la cellule que certains événements se produisent dans un ordre erroné, par exemple, que la mitose débute avant que les chromosomes n'aient été répliqués. Comment l'ordre normal de ces événements est-il maintenu ? La fréquence de division des cellules doit être adaptée aux circonstances. Comment la cellule reçoit-elle de l'environnement les indications qui déterminent si elle doit se diviser ou non ?

La majorité de nos connaissances concernant le cycle cellulaire provient de la combinaison d'études génétiques sur deux levures et d'études biochimiques sur des cultures de cellules de mammifères. La génétique du cycle cellulaire de la levure à reproduction par bourgeonnement *Saccharomyces cerevisiae* et de la levure à reproduction par fission *Schizosaccharomyces pombe* a mis à jour toute une série de fonctions génétiques destinées à assurer le déroulement adéquat du cycle cellulaire (figure 24-7). Ces fonctions sont identifiées par un sous-ensemble spécifique de mutations thermosensibles (ts) appelées *cdc* (cycle de division cellulaire). Lorsqu'elles sont cultivées à basse température, les levures porteuses de ces mutations *cdc* se développent normalement. Mais lorsqu'elles sont transférées à des températures plus élevées, dites restrictives, elles cessent de croître. Ce qui était nouveau chez ces mutations *cdc* par rapport à la classe plus générale des mutations thermosensibles, c'est qu'un mutant *cdc* donné s'arrêtait de croître à un endroit précis du cycle et que, au moment de cet arrêt, toutes les cellules s'avéraient identiques. Considérons quelques exemples de ce comportement chez *S. cerevisiae*, une levure qui se divise par bourgeonnement, un processus dans lequel une cellule mère forme une petite excroissance appelée «un bourgeon». Le bourgeon se développe et une mitose a lieu de sorte qu'un pôle du fuseau se trouve dans la cellule mère et l'autre dans le bourgeon. Le bourgeon continue à croître jusqu'à ce qu'il soit aussi gros que la cellule mère et les deux se séparent pour former deux cellules filles. Un mutant ts ordinaire de *S. cerevisiae*, lorsqu'il est transféré à une température restrictive, cesse de croître à des moments variables du cycle de bourgeonnement et de croissance. Au contraire, un mutant *cdc* particulier de *S. cerevisiae* transféré à une température restrictive ne produit que des cellules munies d'un bourgeon minuscule, tandis qu'un autre produit exclusivement des bourgeons dont la taille est la moitié de celle d'un bourgeon normal, et ainsi de suite. Ces phénotypes variés des mutants *cdc* reflètent différentes défectuosités de la machinerie qui réalise les étapes spécifiques de la progression du cycle cellulaire. Nous résumerons ci-après les caractéristiques principales des gènes qui interviennent dans le cycle cellulaire ainsi que des protéines pour lesquelles ils codent.

Les cyclines et les protéine kinases cycline-dépendantes

Les principaux déclics qui induisent la progression d'une étape du cycle à la suivante sont deux polypeptides qui interviennent en tant que sous-unités d'un hétérodimère : les **cyclines** et les **CDK** (protéine kinases cycline-dépendantes). Les cyclines sont nommées ainsi parce qu'elles ne sont synthétisées qu'à un moment particulier du cycle cellulaire. Toutes les cyclines sont apparentées par leurs séquences d'acides aminés, ce qui reflète probablement des structures tridimensionnelles similaires. Les protéine kinases sont des enzymes qui phosphorylent certains acides aminés de protéines spécifiques. Les substrats protéiques (les protéines cibles qui sont phosphorylées) sont différents pour des protéines kinases différentes. La phosphorylation peut altérer l'activité de la protéine substrat. Une CDK a la capacité de phosphoryler certaines sérines ou thréonines de sa protéine cible. Chez *S. cerevisiae*, il n'y a qu'une seule CDK, codée par le gène *cdc28*. (Chez les mammifères, il existe une famille de CDK apparentées que nous discuterons plus loin). Les protéines qui servent de cibles sont déterminées par des interactions avec les cyclines qui leur sont associées. En d'autres mots, la cycline attache la protéine cible pour qu'elle soit phosphorylée par la CDK. Puisque des cyclines différentes sont présentes aux différentes phases du cycle (figure 24-8), les différentes phases sont caractérisées par la phosphorylation de protéines cibles différentes.

Les cibles des CDK

Comment la phosphorylation de certaines protéines cibles peut-elle contrôler le cycle cellulaire ? La phosphorylation est le point de départ d'une suite d'événements qui culmine avec l'activation de facteurs qui favorisent la transcription de certains gènes dont les produits sont requis pour l'étape suivante du cycle. Un exemple très

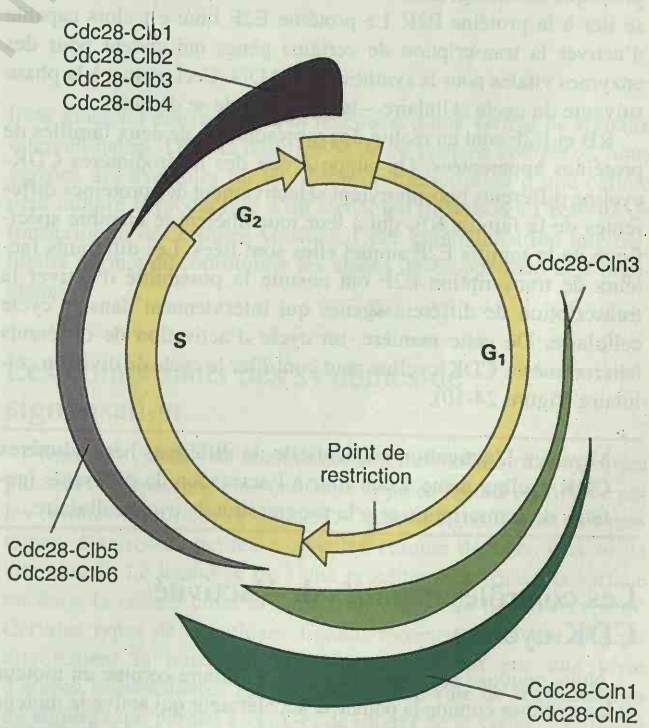


Figure 24-8. Les variations des activités cycline-CDK au cours du cycle cellulaire de *S. cerevisiae*. La largeur des bandes indique les activités kinasiques relatives des divers complexes cycline-CDK. Il y a plusieurs cyclines différentes (désignées par Clb et Cln) chez cette levure mais une seule CDK (codée par le gène *cdc28*). Le point de restriction est le stade où la cellule se trouve irréversiblement engagée dans la mitose. (Reproduit d'après H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

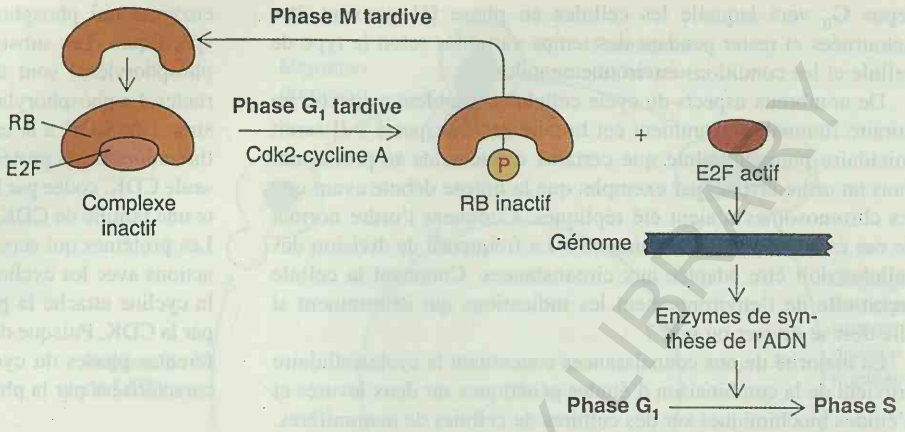


Figure 24-9. Les contributions des protéines RB et E2F à la régulation de la transition des phases G_1 à S d'une cellule de mammifère. (Reproduit de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

clair est celui de la voie RB-E2F dans les cellules de mammifères. RB est la cible d'un hétérodimère CDK-E2F appelé Cdk2-cycline A et E2F est le facteur de transcription qui est régulé par RB. De la fin de la phase M au milieu de la phase G1, les protéines RB et E2F sont combinées dans un complexe protéique inactif pour l'activation de la transcription. A la fin de G_1, le complexe Cdk2-cycline A est produit et phophoryle la protéine RB. Cette phosphorylation provoque un changement de conformation de RB qui ne peut plus se lier à la protéine E2F. La protéine E2F libre est alors capable d'activer la transcription de certains gènes qui codent pour des enzymes vitales pour la synthèse de l'ADN. Ceci permet à la phase suivante du cycle cellulaire—la phase S—de se dérouler.

RB et E2F sont en réalité des représentants de deux familles de protéines apparentées. On suppose que des hétérodimères CDK-cycline différents phosphorylent sélectivement des protéines différentes de la famille RB, qui à leur tour libèrent le membre spécifique de la famille E2F auquel elles sont liées. Les différents facteurs de transcription E2F ont ensuite la possibilité d'activer la transcription de différents gènes qui interviennent dans le cycle cellulaire. De cette manière, un cycle d'activation de différents hétérodimères CDK-cycline peut contrôler le cycle de division cellulaire (figure 24-10).

Message L'activation séquentielle de différents hétérodimères CDK-cycline mène à son tour à l'activation de différents facteurs de transcription et à la progression du cycle cellulaire.

Les contrôles négatifs de l'activité CDK-cycline

Nous pouvons considérer le cycle cellulaire comme un moteur et les cyclines comme la pédale d'accélérateur qui active le moteur CDK. Mais pour être efficace, le système exige aussi de pouvoir freiner afin d'éviter que le cycle cellulaire ne progresse dans des conditions inadéquates.

Par l'activation de protéines capables de se lier aux hétérodimères CDK-cyclines et d'inhiber leur activité de protéine kinase, le cycle cellulaire peut être maintenu à l'arrêt jusqu'à ce que différents mécanismes de surveillance donnent le «feu vert» indiquant que la cellule est prête pour l'étape suivante du cycle.

Un exemple de la façon dont ce système opère concerne la réparation des lésions de l'ADN (figure 24-11). Lorsque l'ADN est endommagé par les rayons X au cours de la phase G_1, par exemple, l'activité CDK des hétérodimères CDK-cycline est inhibée. L'inhibition semble exercée par une protéine appelée p53. Une partie de la protéine p53 reconnaît certains types de défauts d'appariement de l'ADN. En présence de tels défauts, p53 a la capacité d'activer une autre protéine, p21. Lorsque son niveau est élevé, p21 se lie à l'hétérodimère CDK-cycline et inhibe son activité protéine kinase. Par les mécanismes que nous venons de décrire, l'inhibition de l'activité protéine kinase de CDK bloque la pro-

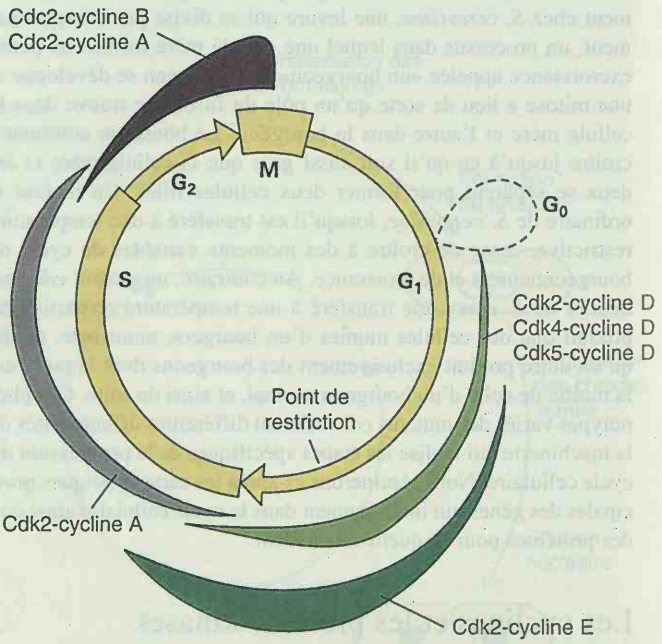


Figure 24-10. Une vue des variations des activités cycline-CDK au cours du cycle cellulaire d'une cellule de mammifère. La largeur des bandes indique les activités kinasiques relatives des divers complexes cycline-CDK. Notez que dans ce cas, contrairement à la levure (voir la figure 24-8), il y a plusieurs cyclines différentes *et* plusieurs CDK différentes. Ceci augmente le nombre de combinaisons de complexes cyclines-CDK qui peuvent se former au cours du cycle cellulaire. (Reproduit de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

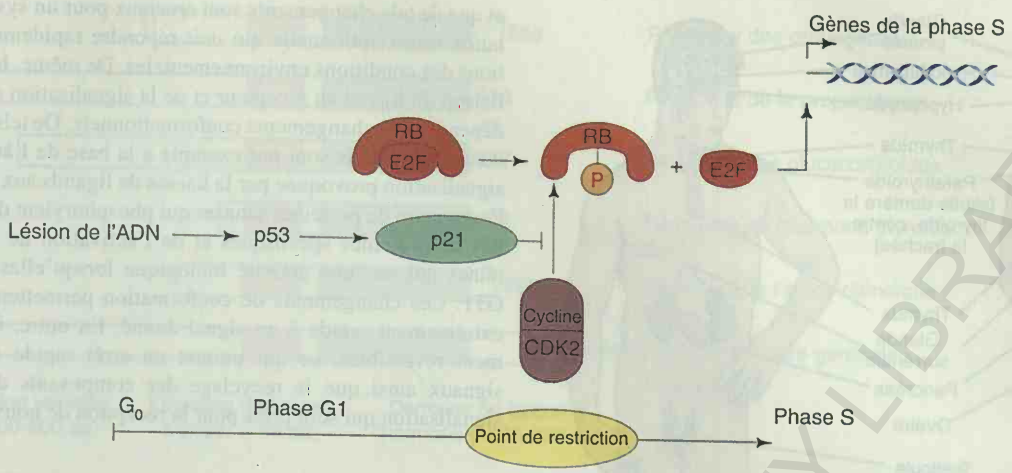


Figure 24-11. Un exemple de contrôle par inhibition de la progression du cycle cellulaire. Chez les mammifères, la transition de la phase G_1 à la phase S exige la phosphorylation de la protéine RB par le complexe CDK2-cycline. En présence d'une lésion de l'ADN, la protéine p53 est induite et, à son tour, induit la protéine p21. Les niveaux élevés de la protéine p21 inhibent l'activité protéine kinase du complexe CDK2-cycline. Lorsque l'ADN est réparé, les niveaux de p53 chutent. A leur tour les niveaux de p21 baissent et l'inhibition de l'activité protéine kinase de CDK2-cycline est levée. Ceci permet à RB d'être phosphorylée et à E2F de devenir un facteur de transcription actif, permettant ainsi à la cellule d'entrer en phase S. (Adapté de C. J. Sherr et J. M. Roberts, *Genes and Development* 9, 1995, 1150.)

gression du cycle jusqu'à ce que le défaut d'appariement soit réparé et conduise à une chute du niveau de p53 et à la levée de l'inhibition de l'activité protéine kinase du complexe CDK cycline.

Ainsi, des **postes de contrôle** qui enregistrent l'état de la réplication de l'ADN, du fuseau mitotique et d'autres composants importants du cycle cellulaire existent et peuvent jouer le rôle de systèmes de freinage lorsque c'est nécessaire. La clé de ce mécanisme est l'existence de protéines régulatrices capables de moduler l'activité protéine kinase du complexe cycline-CDK. Outre son rôle d'enregistreur des conditions intracellulaires, le circuit qui contrôle le cycle cellulaire est également sensible aux informations apportées par des signaux issus d'autres cellules. Certaines protéines sécrétées sont connues pour empêcher les cellules de se diviser. Ces protéines se lient à des récepteurs à la surface des cellules cibles et déclenchent chez celles-ci une réponse qui conduit à l'activation d'une protéine capable d'inhiber l'activité enzymatique de l'hétérodimère CDK-cycline. Nous verrons au chapitre suivant comment ces molécules jouent ce rôle de signal et comment opèrent leurs récepteurs.

Message Des postes de contrôle garantissent que le cycle cellulaire ne progressera pas tant que la cellule ne sera pas compétente.

La communication intercellulaire

La physiologie et le développement adéquats des organismes multicellulaires dépendent de la coordination des fonctions de leurs différents tissus et organes, ainsi que de la coordination des cellules dans un même tissu ou organe. Cette coordination est réalisée grâce à l'émission et à la réception d'une variété de signaux intercellulaires. Dans la description de ce système complexe, nous verrons des exemples où le niveau de transcription d'une cellule peut induire la production d'un signal qui influencera l'activité de transcription des cellules voisines. Cette communication intercellulaire permet de coordonner les étapes développement de l'organisme.

Les composants des systèmes de signalisation

Tous les systèmes de communication intercellulaire comportent plusieurs composants. Une molécule appelée **ligand** est libérée par les cellules émettrices de signaux. Certains signaux sont des protéines, d'autres de petites molécules comme des stéroïdes ou la vitamine D. Le ligand se lie à une protéine réceptrice à la surface ou dans la cellule cible et forme un complexe ligand-récepteur. Certains types de complexes ligands-récepteurs peuvent affecter directement la transcription. D'autres opèrent par une série d'étapes intermédiaires qui constituent une **voie de transduction de signaux** qui permet à ceux-ci de migrer de la surface cellulaire au noyau où il peuventt influencer la transcription. Certains ligands sont des molécules non polaires capables de traverser directement la membrane cellulaire. Pour de telles ligands, les récepteurs se trouvent dans le cytoplasme ou dans le noyau. D'autres ligands comme les polypeptides et les molécules polaires ne peuvent pas pénétrer directement dans la cellule. Leurs récepteurs sont des protéines transmembranaires enchâssées dans la membrane cellulaire.

Certains signaux appelés **hormones** sont transmis à longue distance dans tout l'organisme. Ces hormones jouent le rôle de commutateur principal pour de nombreux tissus différents qui répon-

BCU ASTI LIBRARY

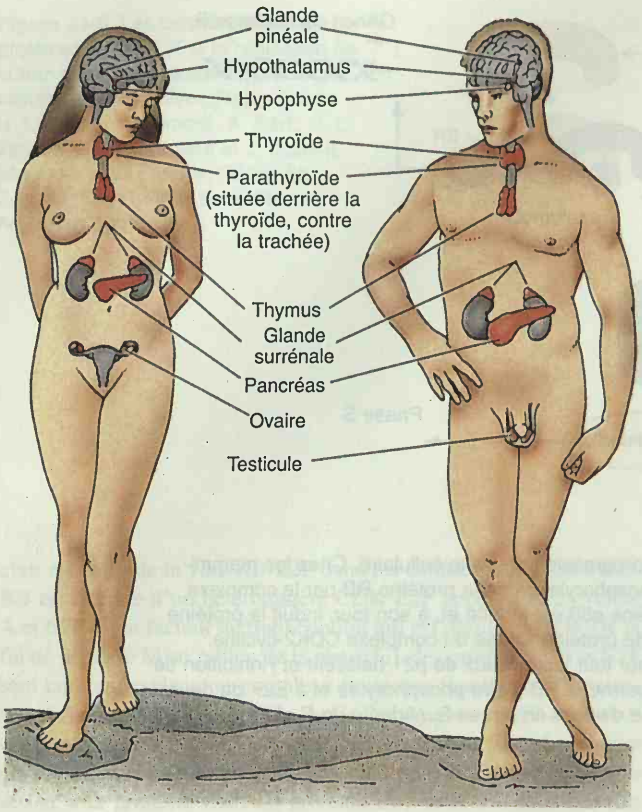


Figure 24-12. Les organes endocrines de l'homme (Reproduit de W. K. Purves, G. H. Orians et H. C. Heller, *Life : The Science of Biology*, 4ième éd. Sinauer Associates, Inc. and W. H. Freeman and Company, 1995.)

dent alors de manière coordonnée. Les hormones sont produites dans les organes du **système endocrine**, un ensemble de glandes distribuées dans tout l'organisme (figure 24-12). Les hormones sont sécrétées dans le système circulatoire et peuvent donc atteindre des organes très éloignés de leur site de sécrétion (figure 24-13a). Certains signaux endocrines agissent sur des tissus cibles situés dans tout l'organisme. Ce sont par exemple les androgènes (hormones masculinisantes) et les œstrogènes (hormones féminisantes) sécrétées respectivement par les ovaires et les testicules. D'autres hormones n'agissent que sur quelques tissus parmi beaucoup d'autres ; c'est le cas des hormones sécrétées par l'hypophyse, qui agissent sur les ovaires.

D'autres ligands encore agissent de manière **paracrine** (figure 24-13). Ils n'entrent pas dans le système circulatoire mais agissent seulement localement, dans certains cas uniquement sur des cellules immédiatement adjacentes. Les signaux paracrines représentent une part très importante du mécanisme qui contrôle le développement, ainsi que nous le verrons dans le chapitre 25.

Régulation de la signalisation par changement de conformation de protéines

Dans la discussion de l'opéron (chapitre 18), nous avons vu que des changements de conformation du répresseur ou de l'inducteur peuvent être induits par des interactions avec de petites molécules et que de tels changements sont cruciaux pour un système de régulation transcriptionnelle qui doit répondre rapidement aux variations des conditions environnementales. De même, les étapes de la liaison du ligand au récepteur et de la signalisation dans la cellule dépendent de changements conformationnels. De tels changements conformationnels sont par exemple à la base de l'activation de la signalisation provoquée par la liaison de ligands aux récepteurs, de l'activation de protéines kinases qui phosphorylent des acides aminés de protéines spécifiques et de l'activation de certaines protéines qui ont une activité biologique lorsqu'elles sont liées au GTP. Ces changements de conformation permettent une réponse extrêmement rapide à un signal donné. En outre, ils sont facilement réversibles, ce qui permet un arrêt rapide des effets des signaux ainsi que le recyclage des composants du système de signalisation qui sont prêts pour la réception de nouveaux signaux.

La superfamille des récepteurs des hormones stéroïdes

Différents ligands, y compris diverses hormones stéroïdes et d'autres molécules relativement petites telles que l'hormone thyroïde et la vitamine D, sont capables de traverser directement la membrane plasmique de la cellule en raison de leurs structures non polaires. Les récepteurs de ces ligands (figure 24-14a) forment la superfamille des **récepteurs des hormones stéroïdes**, un groupe de protéines apparentées par la structure et l'évolution auquel on a donné ce nom sur base des premiers ligands dont on a montré l'association avec de tels récepteurs. Les ligands se lient à ces récepteurs qui sont séquestrés dans le cytoplasme où ils sont liés à d'autres protéines (figure 24-14b). Lorsqu'un ligand se lie à son

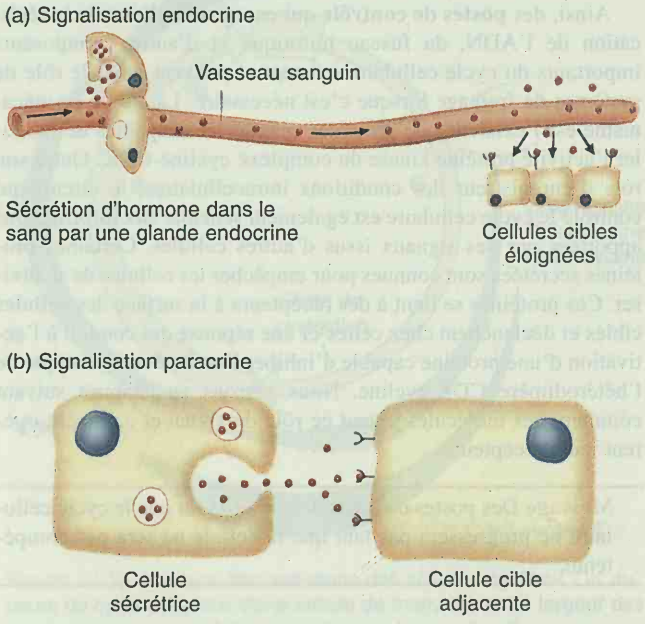


Figure 24-13. Modes de signalisation intercellulaire. (a) Les signaux endocrines entrent dans le système circulatoire et peuvent être reçus par des cellules cibles éloignées. (b) Les signaux paracrines agissent localement et sont reçus par des cellules cibles proches. (Reproduit de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

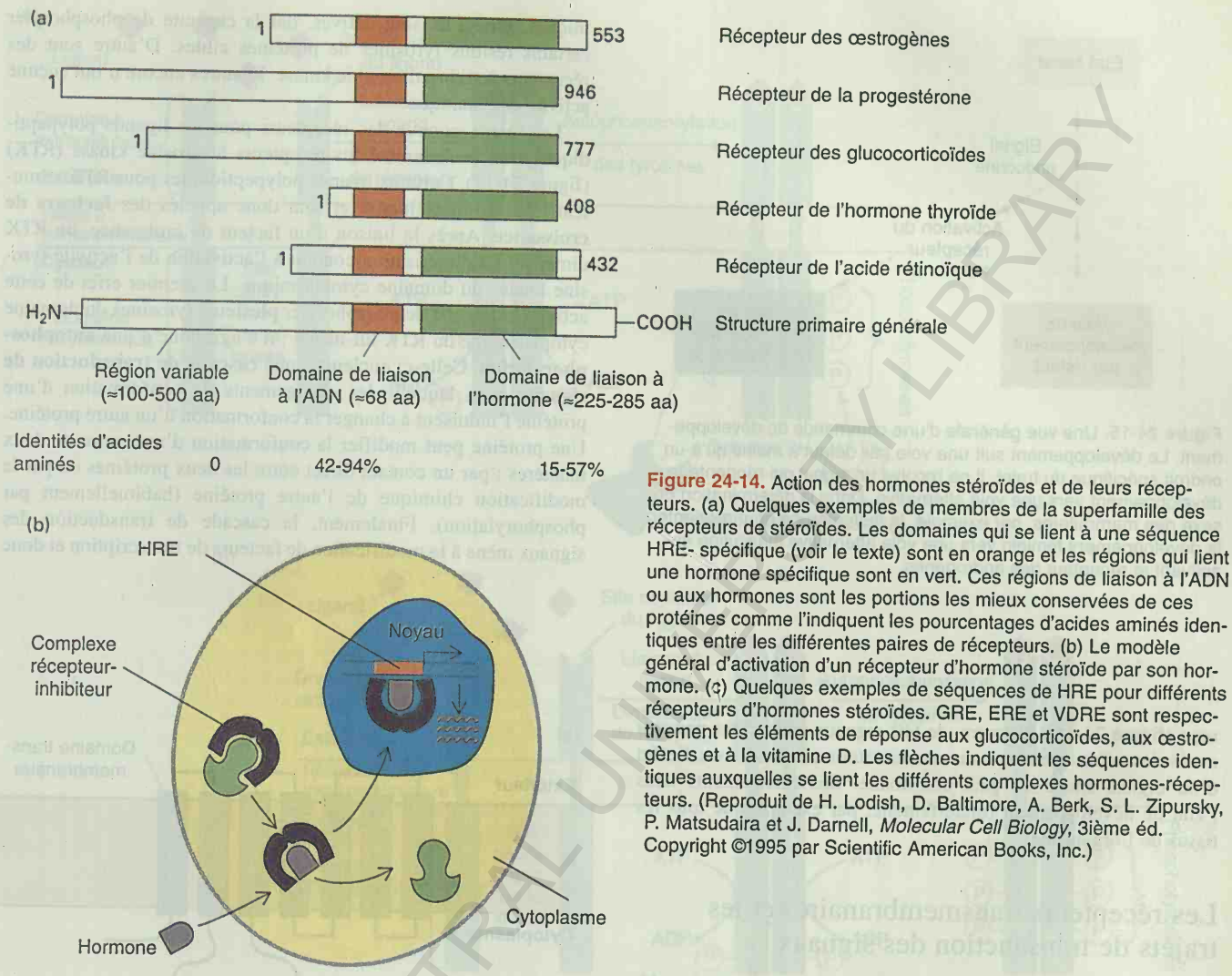


Figure 24-14. Action des hormones stéroïdes et de leurs récepteurs. (a) Quelques exemples de membres de la superfamille des récepteurs de stéroïdes. Les domaines qui se lient à une séquence HRE- spécifique (voir le texte) sont en orange et les régions qui lient une hormone spécifique sont en vert. Ces régions de liaison à l'ADN ou aux hormones sont les portions les mieux conservées de ces protéines comme l'indiquent les pourcentages d'acides aminés identiques entre les différentes paires de récepteurs. (b) Le modèle général d'activation d'un récepteur d'hormone stéroïde par son hormone. (c) Quelques exemples de séquences de HRE pour différents récepteurs d'hormones stéroïdes. GRE, ERE et VDRE sont respectivement les éléments de réponse aux glucocorticoïdes, aux œstrogènes et à la vitamine D. Les flèches indiquent les séquences identiques auxquelles se lient les différents complexes hormones-récepteurs. (Reproduit de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

récepteur, des changements de structure de ce récepteur provoquent sa dissociation de la protéine qui le séquestre et sa migration vers le noyau. Dans le noyau, le complexe hormone-récepteur est alors capable, de concert avec d'autres facteurs de transcription, d'activer ou de réprimer la transcription des gènes cibles en se liant à des séquences régulatrices en cis appelées éléments de réponses aux hormones (HRE pour hormone response elements) (figure 24-14c).

La détermination du sexe chez les mammifères a lieu sous l'action des hormones stéroïdes et de leurs récepteurs. Chez les embryons humains, par exemple, le sexe est déterminé après environ 6 à 8 semaines de gestation suivant que des testicules se sont formés ou pas. Si des testicules sont présents, ils sécrètent de la testostérone—une hormone stéroïde masculinisante—qui active le récepteur de la testostérone de cellules cibles et induit la trancription de gènes mâle-spécifiques. En l'absence de testostérone, l'embryon se développe par «défaut» en un organisme féminin. Ainsi, la détermination du sexe chez les mammifères obéit à une commande «marche-arrêt». En absence d'activation du récepteur de la testostérone, le programme dit de développement par défaut, qui est en place, conduit à un phénotype féminin. Le signal endocrine qui active le récepteur de la testostérone est la commande «marche» qui oriente l'organisme vers le programme de développement mâle. La biologie de la détermination du sexe sera considérée d'une manière plus détaillée au chapitre 25.

Comme nous l'avons vu au chapitre 23, ceci est un exemple courant de décision dans le développement dans lequel une cellule est prédéterminée à suivre un trajet de développement donné mais peut être aiguillée vers un autre trajet si un signal adéquat est

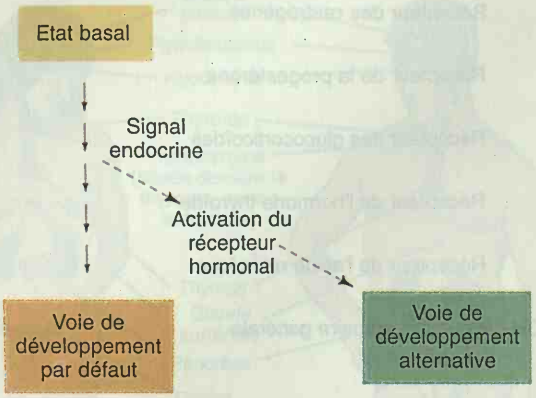


Figure 24-15. Une vue générale d'une commande de développement. Le développement suit une voie par défaut à moins qu'à un endroit spécifique du trajet, il ne reçoive un signal qui réoriente le développement vers une voie alternative. Dans la détermination du sexe des mammifères, par exemple, la testostérone peut réorienter le développement féminin vers une voie alternative masculine en activant le récepteur des androgènes.

reçu (figure 24-15). En outre, de tels signaux endocrines peuvent avoir des effets globaux—un commutateur actionné sous l'effet d'un organe endocrine peut coordonner des changements dans l'état de développement (mâle-femelle, par exemple) de tous les tissus de l'organisme.

Les récepteurs transmembranaires et les trajets de transduction des signaux

Beaucoup de ligands sont des polypeptides ou d'autres molécules polaires qui ne peuvent pas traverser directement la membrane plasmique. Leurs cibles sont juste à l'extérieur de cette membrane et peuvent interagir avec des récepteurs qui sont ancrés dans la membrane. Ces interactions ligands-récepteurs déclenchent un signal chimique dans le cytoplasme juste à l'intérieur de la membrane plasmique. De tels signaux sont transmis par l'intermédiaire d'une série de molécules pour finalement modifier la structure des facteurs de transcription dans le noyau, conduisant à l'activation de la transcription de certains gènes et à la répression d'autres.

Les récepteurs transmembranaires comportent une partie extérieure à la cellule (le domaine extracellulaire), une portion intermédiaire qui traverse une ou plusieurs fois la membrane plasmique et une autre portion située à l'intérieur de la membrane (le domaine cytoplasmique) (figure 24-16).

Le domaine extracellulaire du récepteur est le site auquel se lie le ligand. De nombreux ligands polypeptidiques sont des dimères qui peuvent se lier simultanément à deux monomères de récepteur. Cette liaison simultanée place les domaines cytoplasmiques des deux sous-unités de récepteur à proximité immédiate l'une de l'autre et active l'activité de signalisation de ces domaines cytoplasmiques. Certains récepteurs de ligands polypeptidiques sont des **récepteurs à tyrosine kinase**. Leurs domaines cytoplasmiques, lorsqu'ils sont activés, ont la capacité de phosphoryler certains résidus tyrosines de protéines cibles. D'autre sont des récepteurs à serine-thréonine kinase. D'autres encore n'ont aucune activité enzymatique.

Les mieux connus des récepteurs pour les ligands polypeptidiques sont probalement les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) (figure 24-17). Certains ligands polypeptidiques pour RTK stimulent la division cellulaire et sont donc appelés des **facteurs de croissance**. Après la liaison d'un facteur de croissance, un RTK dimérise. La dimérisation conduit à l'activation de l'activité tyrosine kinase du domaine cytoplasmique. Le premier effet de cette activité kinase est de phosphoryler plusieurs tyrosines du domaine cytoplasmique du RTK lui-même ; il s'agit donc d'une **autophosphorylation**. Celle-ci enclenche une **cascade de transduction de signaux** dans laquelle les changements de conformation d'une protéine l'induisent à changer la conformation d'un autre protéine. Une protéine peut modifier la conformation d'une autre de deux manières : par un contact direct entre les deux protéines ou par la modification chimique de l'autre protéine (habituellement par phosphorylation). Finalement, la cascade de transduction des signaux mène à la modification de facteurs de transcription et donc

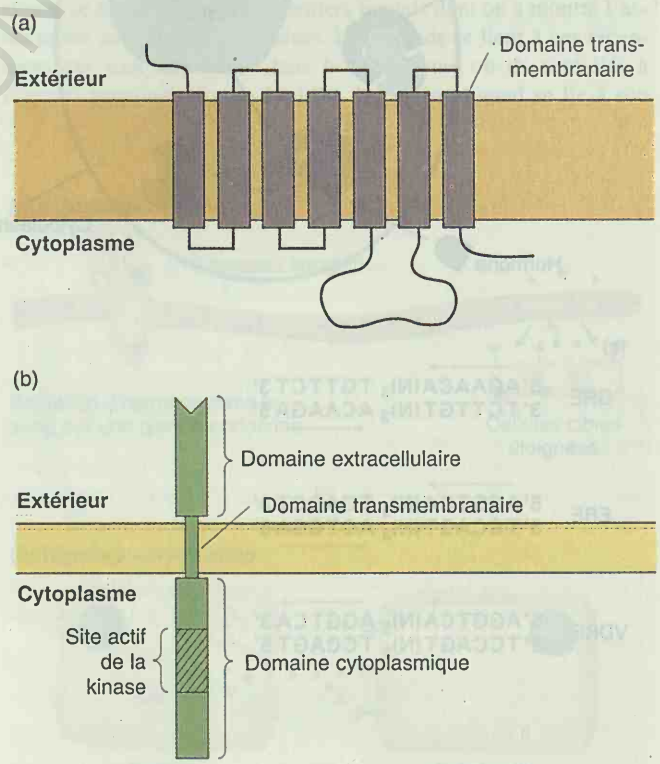


Figure 24-16. Exemples de récepteurs transmembranaires. (a) Un récepteur qui traverse sept fois la membrane. (b) Un récepteur à tyrosine kinase (RTK). Il possède un seul domaine transmembranaire. Le domaine extracellulaire se lie au ligand. Le site actif de la tyrosine kinase est dans le domaine cytoplasmique. (Adapté de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.

MASSEY CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

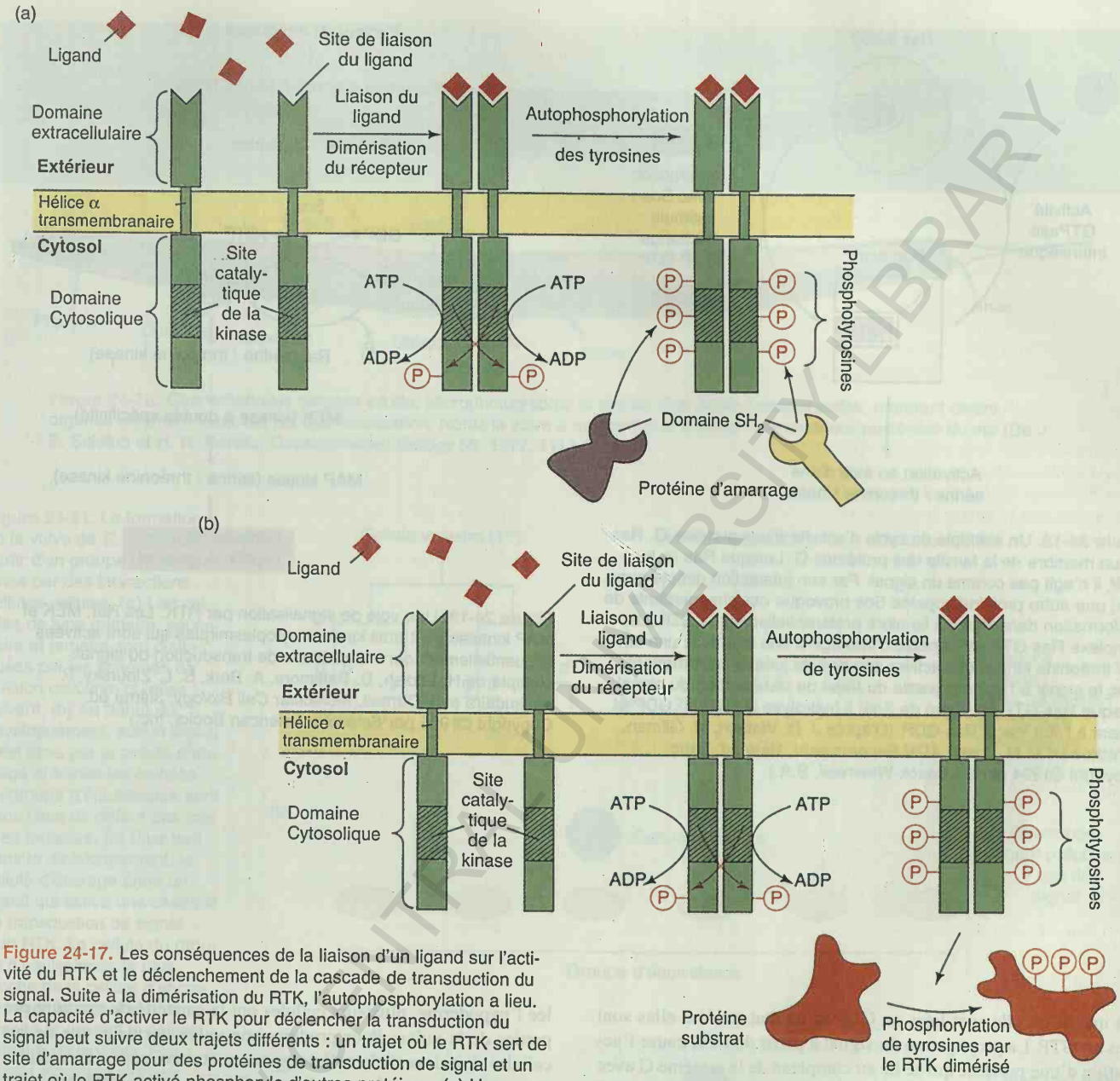


Figure 24-17. Les conséquences de la liaison d'un ligand sur l'activité du RTK et le déclenchement de la cascade de transduction du signal. Suite à la dimérisation du RTK, l'autophosphorylation a lieu. La capacité d'activer le RTK pour déclencher la transduction du signal peut suivre deux trajets différents : un trajet où le RTK sert de site d'amarrage pour des protéines de transduction de signal et un trajet où le RTK activé phosphoryle d'autres protéines. (a) Une conséquence de l'autophosphorylation est de créer des sites de liaison pour des protéines adaptatrices ou d'«amarrage» qui se lient à des sites qui incluent les résidus tyrosine phosphorylés spécifiques. Par l'amarrage de différentes protéines adaptatrices très près les unes des autres, les changements de conformation des complexes protéine-protéine causent l'induction des activités de transduction des signaux de ces protéines. (b) L'autre conséquence de la dimérisation et de l'autophosphorylation est que le RTK phosphoryle des protéines substrats et, par l'intermédiaire de cette phosphorylation, induit leurs activités de transduction de signaux.

à des changements de l'activité de nombreux gènes de la cellule cible.

Dans le cas des RTK, la phosphorylation du récepteur a deux conséquences qui contribuent toutes les deux à l'activation des cascades de transduction de signaux. En raison des changements de conformation du RTK autophosphorylé, celui-ci se lie à certaines protéines cibles et les phosphoryle, en causant dans ces protéines cibles un changement de conformation qui leur permet de propager le signal. De plus, le RTK phosphorylé se lie à diverses **protéines adaptatrices ou protéines d'amarrage.** Les interactions entre ces protéines adaptatrices induisent ensuite des changements de conformation d'un élément de signalisation, l'activent et propagent donc le signal.

Très souvent, l'étape suivante de la transmission du signal est l'activation d'une **protéine G.** Les protéines G oscillent entre un

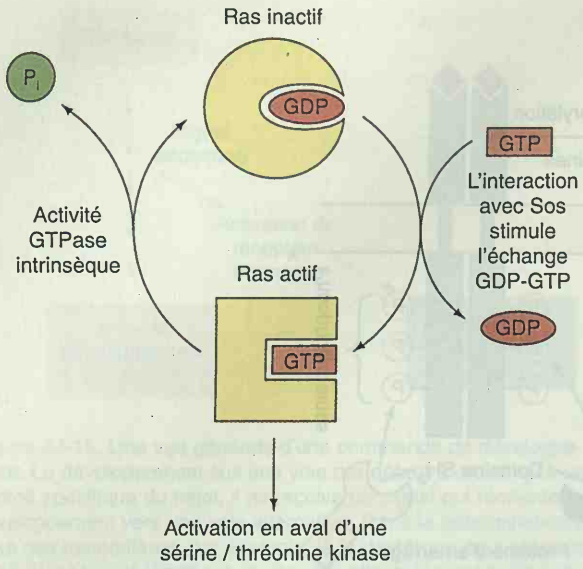


Figure 24-18. Un exemple de cycle d'activité d'une protéine G. Ras est un membre de la famille des protéines G. Lorsque Ras lie le GDP, il n'agit pas comme un signal. Par son interaction directe avec Ras, une autre protéine appelée Sos provoque des changements de conformation dans Ras qui lie alors préférentiellement le GTP. Le complexe Ras-GTP est capable d'interagir à son tour avec une sérine / thréonine kinase et d'activer son activité kinase, transmettant donc le signal à l'étape suivante du trajet de transduction du signal. Lorsque Ras-GTP est libéré de Sos, il hydrolyse le GTP en GDP et revient à l'état inactif Ras-GDP. (D'après J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *ADN Recombinant*, 1ière éd. franç. Copyright ©1994 par De Boeck-Wesmael, S.A.)

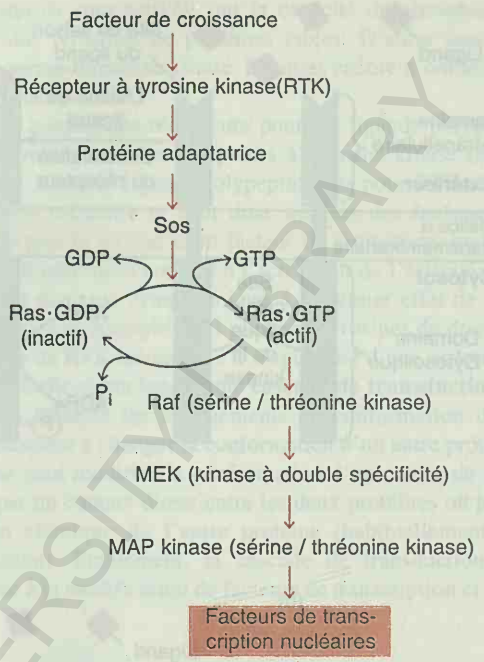


Figure 24-19. Une voie de signalisation par RTK. Les Raf, MEK et MAP kinases sont trois kinases cytoplasmiques qui sont activées séquentiellement dans la cascade de transduction du signal. (Adapté de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

état inactif où elle sont liées au GDP et un état actif où elles sont liées au GTP. La propagation du signal à partir du RTK cause l'activation d'une protéine qui se lie au complexe de la protéine G avec le GDP et change sa conformation de manière à ce qu'elle se lie à une molécule de GTP (figure 24-18). La protéine Ras est une protéine G d'une importance particulière pour la carcinogénèse.

La protéine G activée par sa liaison au GTP se lie ensuite à une protéine kinase cytoplasmique, modifie la conformation de celle-ci et active son activité protéine kinase. Cette protéine kinase phosphoryle ensuite d'autres protéines y compris d'autres protéines kinases. Les cibles de certaines de ces kinases sont des facteurs de transcription. La phosphorylation des facteurs de transcription change leur conformation, provoquant une activation de la transcription de certains gènes et une répression de la transcription d'autres gènes (figure 24-19).

La formation de la vulve du nématode *C. elegans* est un bon exemple de la manière dont la signalisation paracrine par l'intermédiaire d'un RTK contribue à la prise de décision dans le développement (figure 24-20). Ce processus a été étudié en détail par l'analyse de mutants qui n'ont pas de vulve ou en ont trop. La vulve est l'orifice de l'enveloppe du ver qui permet la sortie des œufs venant de l'utérus. Dans l'enveloppe corporelle du ver, appelée l'hypoderme, plusieurs cellules ont la capacité de produire des parties de la vulve. Pour produire une vulve normale, une de ces cellules doit devenir la cellule primaire et deux autres les cellules secondaires de la vulve, tandis que d'autres encore deviennent les cellules tertiaires qui contribuent à l'hypoderme environnant.

Initialement, toutes ces cellules peuvent adopter n'importe lequel de ces rôles et forment un **groupe d'équivalence**. La distribution de ces rôles est assurée par une autre cellule, appelée la *cellule d'ancrage*, qui se trouve en dessous des cellules du groupe d'équivalence. La cellule d'ancrage sécrète un polypeptide ligand qui se lie à un RTK présent sur toutes les cellules du groupe d'équivalence. Seule la cellule qui reçoit le niveau le plus élevé de ce signal (la cellule du groupe d'équivalence la plus proche de la cellule d'ancrage) active le trajet de transduction de signal à un niveau suffisant pour activer les facteurs de transcription nécessaires pour que cette cellule adopte le rôle de cellule primaire. Ayant acquis le destin de cellule vulvaire primaire, cette cellule adresse un signal paracrine différent à ses voisines du groupe d'équivalence et les empêche d'interpréter de manière similaire le signal de la cellule d'ancrage et d'adopter également un rôle primaire. Ce processus d'**inhibition latérale** relègue ses voisines dans un rôle de cellules secondaires. Les cellules restantes du groupe d'équivalence se

MCB CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

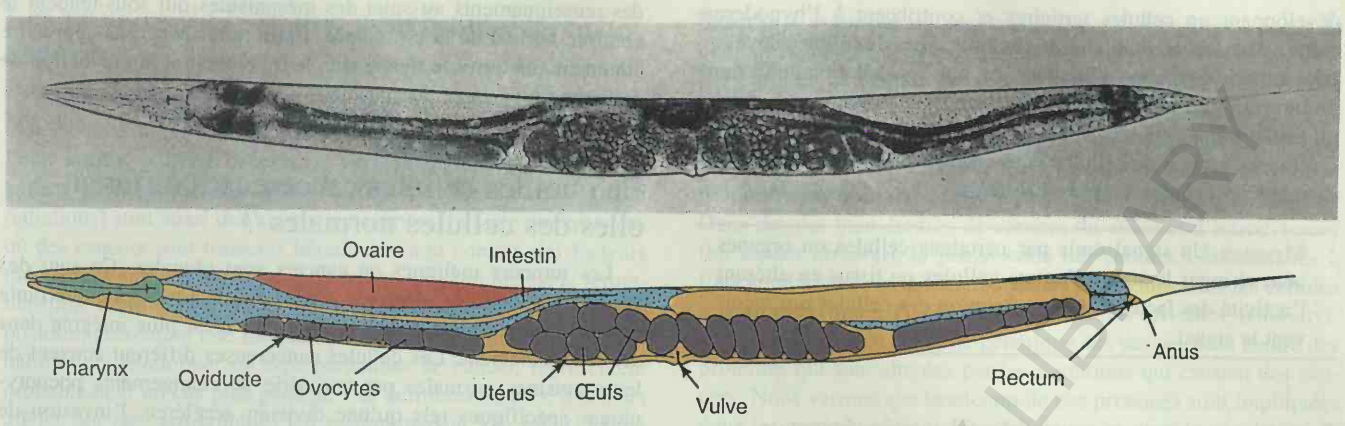
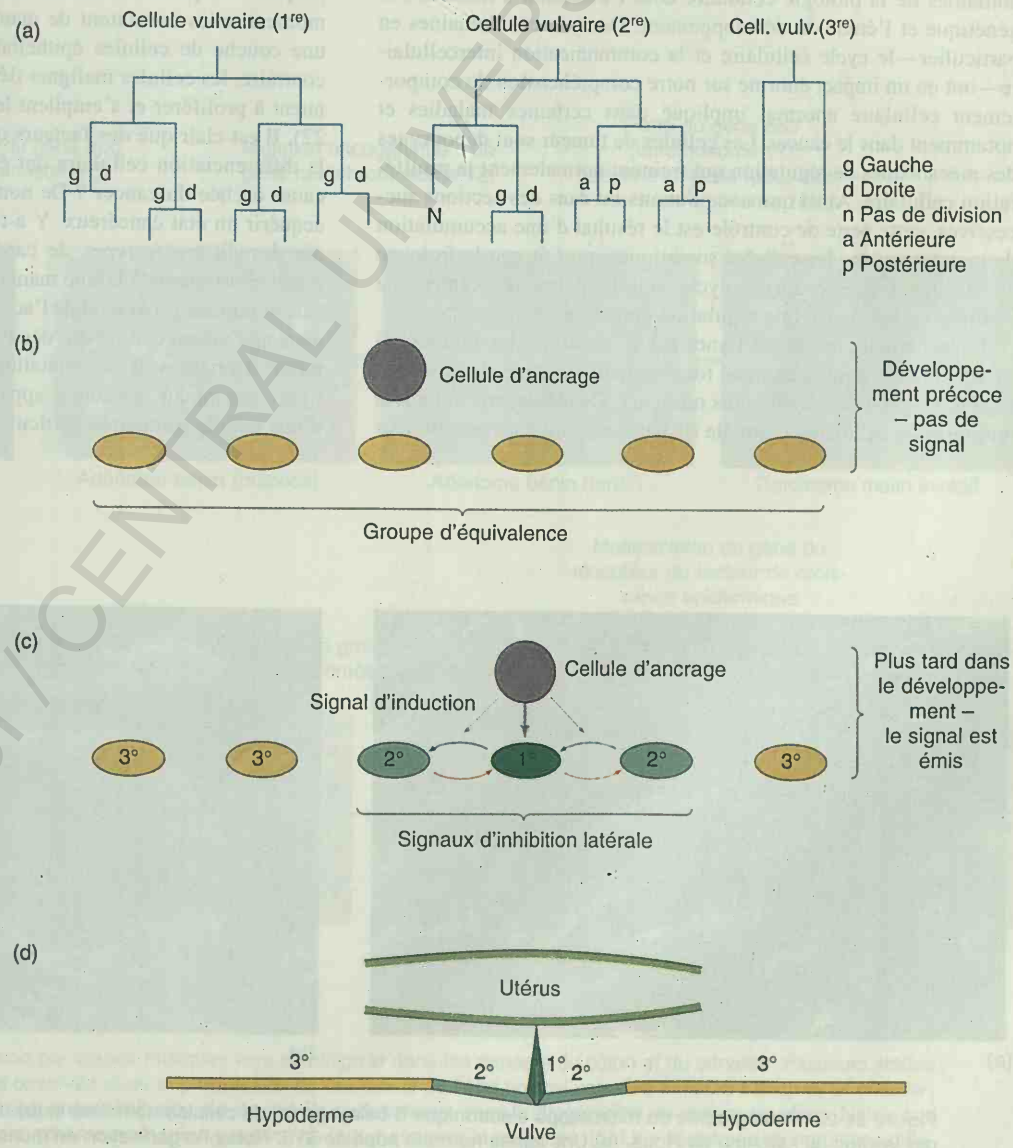


Figure 24-20. *Caenorhabditus elegans* adulte. Microphotographie et dessin d'un adulte hermaphrodite, montrant divers organes aisément identifiés par leur localisation. Notez la vulve à mi-chemin le long de l'axe antérieur-postérieur du ver (De J. E. Sulston et H. R. Horvitz, *Developmental Biology* 56, 1977, 111.)

Figure 24-21. La formation de la vulve de *C. elegans* à partir d'un groupe d'équivalence par des interactions cellules-cellules. (a) Les cellules de type primaire, secondaire et tertiaire sont distinguées par les schémas de division cellulaire qu'elles suivent. (b) Au début du développement, aucun signal n'est émis par la cellule d'ancrage et toutes les cellules du groupe d'équivalence sont dans l'état de défaut des cellules tertiaires. (c) Plus tard dans le développement, la cellule d'ancrage émet un signal qui active une cascade de transduction de signal d'un RTK. La cellule du groupe d'équivalence la plus proche de la cellule d'ancrage reçoit le signal le plus intense et devient la cellule primaire de la vulve. Elle envoie alors des signaux d'inhibition latérale à ses voisines ; elle les empêche ainsi de devenir de cellules vulvaires primaires et les aiguille vers un trajet de cellules vulvaires secondaires. (d) Les portions de l'anatomie de la vulve occupées par les descendantes des cellules du groupe d'équivalence. (Partie a de R. Horvitz et P. Sternberg, *Nature* 351, 1991, 357. Parties b-d adaptées de I. Greenwald, *Trends in Genetics* 7, 1991, 366.)



BIBLIOTECA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

développent en cellules tertiaires et contribuent à l'hypoderme entourant la vulve. Pour chacun des trois types de cellules développées à partir du groupe d'équivalence, une constellation de facteurs de transcription est activée et détermine l'état primaire, secondaire ou tertiaire des cellules. Ainsi, grâce à une série de signaux paracrines, un groupe de cellules équivalentes peut se développer en donnant des cellules de types différents.

Message Un signal émis par certaines cellules ou organes peut changer le statut d'autres cellules ou tissus en altérant l'activité des facteurs de transcription des cellules qui reçoivent le signal.

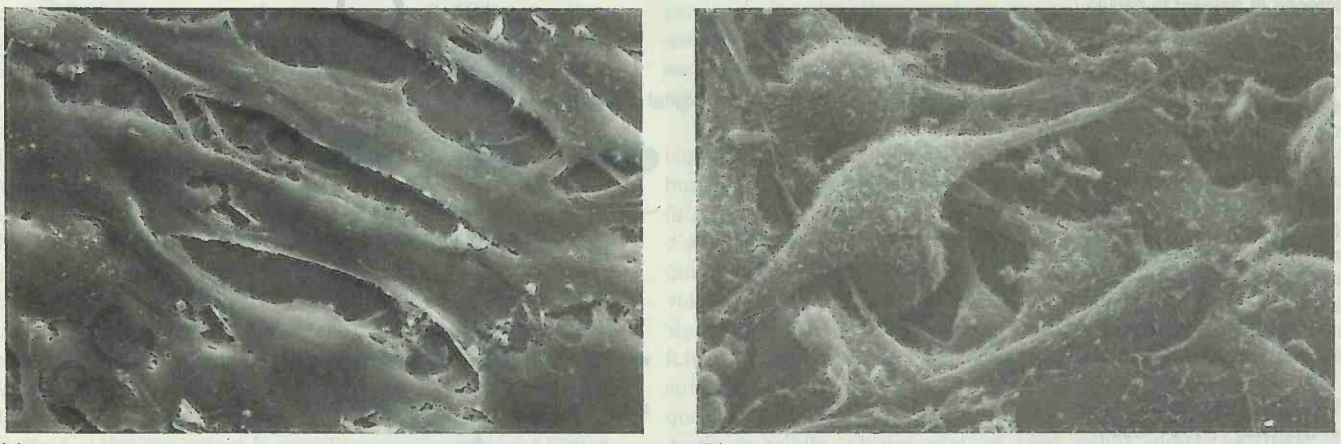
Le cancer : une maladie génétique des cellules somatiques

Dans les sections précédentes, nous avons abordé plusieurs domaines de la biologie cellulaire dont l'évolution a influencé la génétique et l'étude du développement. Deux de ces domaines en particulier—le cycle cellulaire et la communication intercellulaire—ont eu un impact énorme sur notre compréhension du comportement cellulaire anormal impliqué dans certaines maladies et notamment dans le cancer. Les cellules de tumeur sont dépourvues des mécanismes de régulation qui freinent normalement la prolifération cellulaire. Ainsi que nous l'avons vu dans des sections successives, cette perte de contrôle est le résultat d'une accumulation de mutations dans les cellules somatiques qui fait que le freinage normalement exercé sur le cycle cellulaire par les centres de contrôle ou les signaux de régulation paracrine est supprimé.

En génétique, on étudie l'anormal (c'est-à-dire les mutations) en vue de déterminer comment fonctionnent les gènes de type sauvage et les processus cellulaires normaux. De même, en étudiant la prolifération cellulaire anormale (le cancer), nous espérons obtenir des renseignements au sujet des mécanismes qui sous-tendent le contrôle normal de la croissance. Enfin, nous espérons apprendre comment améliorer le diagnostic, le traitement et la prévention de cet important groupe de maladies.

En quoi les cellules cancéreuses diffèrent-elles des cellules normales ?

Les tumeurs malignes ou cancers sont clonales. Ce sont des agrégats de cellules, dérivées d'une cellule fondatrice aberrante qui, bien qu'entourée d'un tissu normal, n'est plus intégrée dans cet environnement. Les cellules cancéreuses diffèrent souvent de leurs voisines normales par une série de changements phénotypiques spécifiques tels qu'une division accélérée, l'invasion de nouveaux territoires cellulaires, une activité métabolique plus intense et une morphologie modifiée. Par exemple, lorsque les cellules d'une couche épithéliale normale sont mises en culture, elles ne peuvent croître que si elles sont accrochées au récipient de culture. D'autre part, les cellules épithéliales normales se multiplient jusqu'à ce qu'elles forment une monocouche continue. A ce moment, elles constatent de manière ou d'autre qu'elles forment une couche de cellules épithéliales et cessent de se diviser. Au contraire, les cellules malignes dérivées d'un tissu épithélial continuent à proliférer et s'empilent les unes sur les autres (figure 24-22). Il est clair que des facteurs qui contrôlent le cours normal de la différenciation cellulaire ont été altérés. Quelle est dès lors la cause cachée du cancer ? De nombreux types de cellules peuvent acquérir un état cancéreux. Y a-t-il un motif commun à l'ontogénie des différents types de cancer ou chacun apparaît-il d'une manière différente ? D'une manière générale, on peut considérer le cancer comme provenant de l'accumulation de mutations multiples dans une même cellule qui dès lors perd le contrôle de sa prolifération. Certaines de ces mutations sont issues des parents par la lignée germinale. D'autres apparaissent de novo dans la lignée d'une cellule somatique particulière.



(a) (b)

Figure 24-22. Photographie au microscope électronique à balayage (a) de cellules normales et (b) de cellules transformées par le virus du sarcome de Rous. (a) Une lignée normale appelée 3T3. Notez l'organisation en monocouche des cellules. (b) Une lignée dérivée par transformation de 3T3. Notez que les cellules sont plus rondes et s'empilent les unes sur les autres. (De J. Darnell, H. Lodish, et D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*, 2ième éd. Copyright ©1990 par Scientific American Books).

Les preuves de l'origine génétique des cancers

Comme nous l'avons vu brièvement au chapitre 7, plusieurs indices ont indiqué l'origine génétique du passage des cellules de l'état normal à l'état cancéreux. On sait depuis de nombreuses années que la plupart des agents carcinogènes (agents chimiques et radiations) sont aussi des agents mutagènes. Il existe quelques cas où des cancers sont transmis héréditairement comme des facteurs mendéliens simples à pénétrance élevée ; un exemple est le rétinoblastome familial (voir la figure 7-25). Mais des allèles de prédisposition, présentant une moindre pénétrance et augmentant la probabilité de développer un type particulier de cancer, représentent probablement un cas plus général. Ces dernières années, plusieurs allèles ont été cartographiés par recombinaison, par les RFLP ou par des techniques apparentées, et clonés (voir le chapitre 15). Les oncogènes, des gènes mutés dominants qui contribuent à provoquer des cancers chez les animaux (voir les pages 482 à 486) ont été isolés à partir de virus tumorigènes qui transforment des cellules normales de certains animaux en cellules formant des tumeurs. Ces oncogènes dominants peuvent être isolés à partir de cellules de tumeurs en utilisant des méthodes d'analyse basées sur des cultures de cellules qui permettent de distinguer les cellules bénignes des cellules malignes. Une tumeur n'apparaît pas à la suite d'un événement génétique unique mais implique un processus à étapes multiples dans lequel plusieurs mutations doivent se produire dans une même cellule pour qu'elle devienne cancéreuse. Dans des cas bien étudiés de cancers du côlon et d'astrocytomes (un cancer cérébral), la progression des cancers a été associée à l'accumulation de plusieurs mutations différentes dans les cellules cancéreuses (figure 24-23). Dans les sections suivantes, nous envisagerons à nouveau l'origine génétique des cancers et la nature des protéines qui sont altérées par les mutations qui causent des cancers. Nous verrons que beaucoup de ces protéines sont impliquées dans les communications intercellulaires et dans la régulation du cycle cellulaire.

Message De nombreuses et peut-être toutes les tumeurs apparaissent à la suite d'une séquence d'événements mutationnels qui mènent à un état de prolifération incontrôlée.

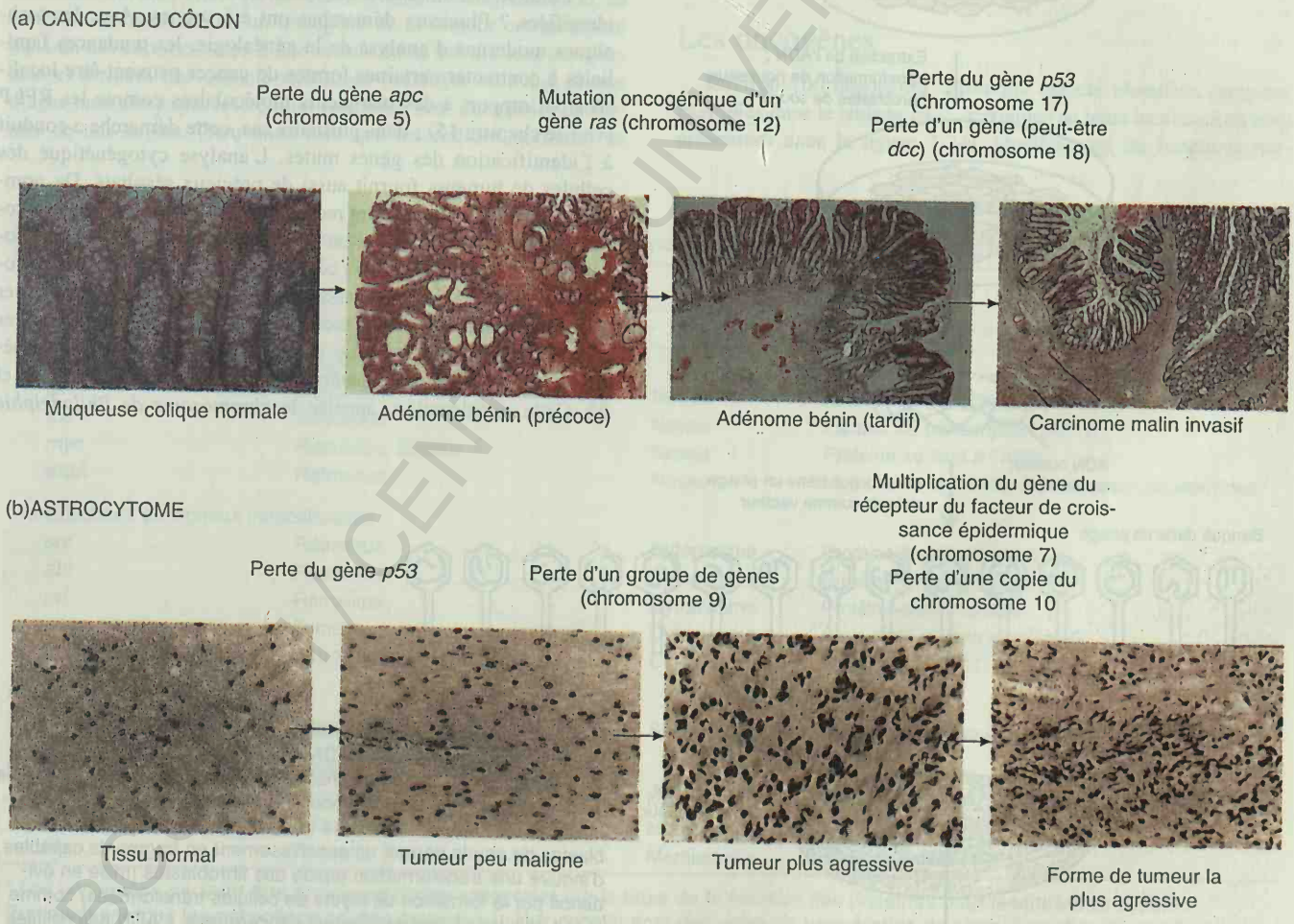


Figure 24-23. La progression par étapes multiples vers la malignité dans les cancers du côlon et du cerveau. Plusieurs stades histologiques distincts sont observés dans la progression de ces tissus de l'état normal vers des tumeurs bénignes et ensuite vers des cancers. (a) Une séquence habituelle d'événements mutationnels dans la progression du cancer du côlon. Notez que la désorganisation du tissu augmente avec la progression de la tumeur vers la malignité. (b) Une séquence de mutations différente dans le cas de la progression vers la malignité d'un astrocytome, une forme de cancer du cerveau. (Microphotographie de E. R. Fearon et K. R. Cho. De W. K. Cavenee et R. L. White, *Scientific American*, Mars 1995, 78-79.)

Les mutations des cellules cancéreuses

Deux types généraux de mutations sont associés aux tumeurs : les mutations dominantes des **oncogènes** et les mutations dans des **gènes suppresseurs de tumeurs** récessifs. Les oncogènes sont mutés de manière telle que la protéine pour laquelle ils codent est «activée» dans les cellules de tumeur. Typiquement, les oncogènes sont des mutations des composants d'une des voies de communication intercellulaire qui font que les cellules se comportent comme si elles recevaient en permanence un signal leur enjoignant de proliférer. Les mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs inactivent des protéines qui contribuent normalement à l'inhibition de la prolifération cellulaire. Ces gènes sont de deux types. Le premier type code pour des protéines impliquées dans un processus d'inhibition de la progression dans le cycle cellulaire. Les mutations récessives des gènes suppresseurs de tumeurs inactivent la protéine inhibitrice. L'autre type de gène suppresseur de tumeur code pour une protéine impliquée dans la réparation des lésions de l'ADN. Les mutations qui inactivent ces gènes de réparation agissent indirectement en augmentant la fréquence à laquelle les oncogènes et d'autres mutations induisant des tumeurs se produisent.

Comment ces mutations qui favorisent les tumeurs ont-elles été identifiées ? Plusieurs démarches ont été suivies. Avec les techniques modernes d'analyse de la généalogie, les tendances familiales à contracter certaines formes de cancer peuvent être localisées par rapport à des marqueurs moléculaires comme les RFLP (voir le chapitre 15) ; dans plusieurs cas, cette démarche a conduit à l'identification des gènes mutés. L'analyse cytogénétique des cellules de tumeurs fournit aussi de précieux résultats. De nombreux types de tumeurs sont reconnus par des translocations chromosomiques caractérisques ou par la délétion de régions chromosomiques particulières. Dans certains cas, ces remaniements chromosomiques sont si invariablement liés à un cancer particulier qu'ils peuvent servir au diagnostic. Par exemple, 95 pour cent des malades atteints de leucémie myéloïde chronique (CML) possèdent une translocation caractéristique entre les chromosomes 9 et 22. Cette translocation, appelée le *chromosome de Philadelphie*

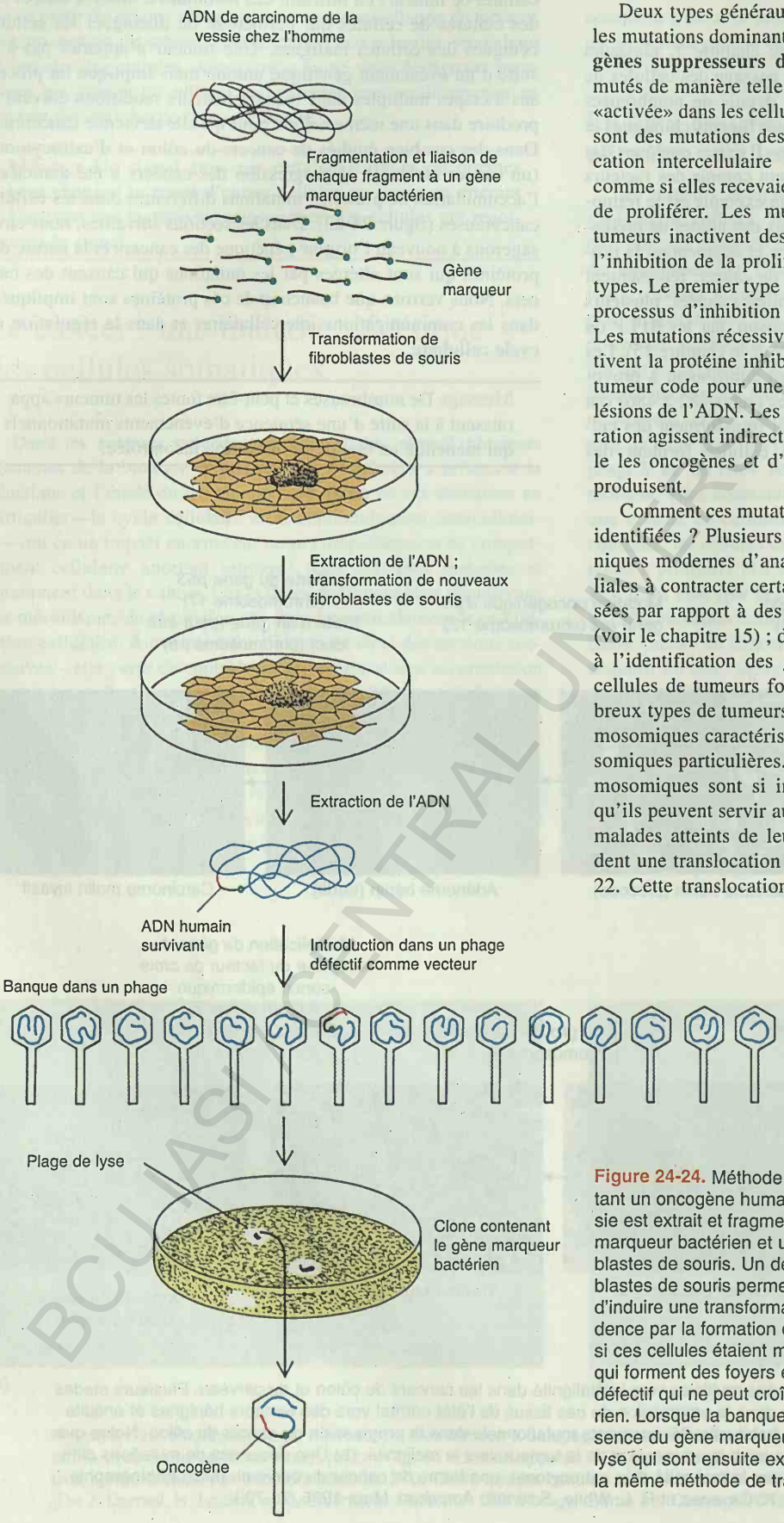


Figure 24-24. Méthode permettant d'identifier un clone d'ADN portant un oncogène humain. L'ADN d'une tumeur humaine de la vessie est extrait et fragmenté ; chaque fragment est attaché à un gène marqueur bactérien et utilisé pour transformer des cellules de fibroblastes de souris. Un deuxième tour de transformation de fibroblastes de souris permet un enrichissement en fragments capables d'induire une transformation rapide des fibroblastes (mise en évidence par la formation de foyers de cellules transformées) comme si ces cellules étaient maintenant cancéreuses. L'ADN des cellules qui forment des foyers est ensuite extrait et cloné dans un phage défectif qui ne peut croître qu'en présence du gène marqueur bactérien. Lorsque la banque est étalée sur un tapis de bactéries, la présence du gène marqueur bactérien est indiquée par des plages de lyse qui sont ensuite examinées pour la présence de l'oncogène par la même méthode de transformation de fibroblastes.

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY

d'après la ville où cette translocation fut décrite pour la première fois, est un point essentiel pour le diagnostic de la CML. Nous envisagerons le chromosome de Philadelphie plus en détail dans ce chapitre. D'autres translocations caractérisent d'autres sortes de tumeurs ; les translocations servant de diagnostic sont le plus souvent associées à des cancers des globules blancs—leucémies et lymphomes. Néanmoins, toutes les mutations qui favorisent les cancers ne sont pas spécifiques d'un type déterminé de cellules. Au contraire, les mêmes mutations peuvent promouvoir des tumeurs pour un certain nombre de types cellulaires et sont donc trouvées dans de nombreux cancers différents.

Certains oncogènes ont été identifiés en utilisant des virus tumorigènes. Par l'analyse mutationnelle du génome de petite taille de ces virus, il est habituellement possible d'associer à un seul gène la capacité de conférer par transformation un phénotype tumoral à des cellules. Il apparaît que ces **gènes de transformation virale** sont des versions mutées de gènes cellulaires normaux. Une autre méthode, également utilisée pour identifier des oncogènes (figure 24-24), est basée sur une logique parallèle à celle d'Avery, McCarthy et McLeod lorsqu'ils prouvèrent que l'ADN est le matériel génétique. Les cellules normales en culture sont baignées dans de l'ADN isolé de cellules de tumeur dans des conditions où les cellules absorberont l'ADN (ce procédé est appelé *transfection*). Si, au cours de la transfection, un oncogène de la tumeur est incorporé dans un des chromosomes d'une cellule, cette cellule sera transformée et formera une colonie exhaussée (ou foyer) sur une plaque d'agar mou alors que les cellules normales sont incapables de former de tels foyers. (Souvenez-vous que les cellules normales ne peuvent pas croître si elle ne sont pas ancrées et arrêtent de croître lorsqu'elles forment une monocouche continue de cellules). A l'aide des techniques de l'ADN recombinant, l'ADN d'oncogène d'un foyer est ensuite joint à l'ADN d'un plasmide bactérien, ou d'un phage servant de vecteur de clonage, qui transfert l'ADN de l'oncogène dans une cellule hôte. De cette façon, il est possible de purifier l'oncogène par les techniques de l'ingénierie génétique.

Dans le cas des cancers humains de la vessie, l'oncogène s'est avéré être une forme mutée d'un gène appelé *ras* dont le produit de type sauvage est une protéine G impliquée dans la transduction d'un signal à un RTK. Le même oncogène *ras* a été identifié dans les tumeurs de la vessie de plusieurs malades. L'observation que de nombreuses tumeurs d'un type particulier contiennent des oncogènes semblables a été répétée pour plusieurs types de cancers différents. Elle a permis d'élucider les progressions mutationnelles présentées dans la figure 24-23.

Message Les mutations qui induisent la formation de tumeurs peuvent être identifiées de diverses manières. Une fois localisées, elles peuvent être clonées et étudiées pour déterminer comment elles contribuent au phénotype tumoral.

Les oncogènes

Environ 100 oncogènes différents ont été identifiés (voir des exemples dans le tableau 24-2 ; certaines de leurs localisations sont présentées dans la figure 7-24). Quelles sont les fonctions nor-

Tableau 24-2. Quelques oncogènes bien caractérisés et les protéines pour lesquelles ils codent

Oncogène*	Mode d'isolement†	Protéine	
		Localisation	Fonction‡
Facteurs de transcription nucléaires			
jun	Rétrovirus	Noyau	Facteur de transcription (AP-1)
fos	Rétrovirus	Noyau	Facteur de transcription (AP-1)
myc	Rétrovirus, tumeur	Noyau	Protéine se liant à l'ADN
erbA	Rétrovirus	Noyau	Membre de la famille des récepteur de stéroïdes
Transducteurs de signaux intracellulaires			
src	Rétrovirus	Cytoplasme	Protéine-tyrosine kinase
abl	Rétrovirus	Cytoplasme	Protéine-tyrosine kinase
raf	Rétrovirus	Cytoplasme	Protéine-sérine kinase
gsp	Tumeur	Cytoplasme	Sous-unité α de la protéine G
ras	Rétrovirus, tumeur	Cytoplasme	Protéine liant le GTP/GDP
Facteurs de croissance			
sis	Rétrovirus	Sécrété	Facteur de croissance (PDGF)
Récepteurs de facteur de croissance			
erbB	Rétrovirus	Membrane	Récepteur pour EGF
fms	Rétrovirus	Membrane	Récepteur pour CSF-1
trk	Tumeur	Membrane	Récepteur pour NGF

* Les oncogènes peuvent être divisés en quatre catégories sur la base de la fonction des protéines pour lesquelles ils codent. Pratiquement tous les oncogènes connus codent pour des constituants des voies de transduction de signaux impliquant des facteurs de croissance.

† La plupart des oncogènes furent d'abord identifiés comme des oncogènes rétroviraux mais certains furent d'abord isolés ou caractérisés en tant qu'oncogènes dans des tumeurs humaines.

‡PDGF=facteur de croissance dérivé des plaquettes ; EGF=facteur de croissance épidermique ; CSF-1=facteur de stimulation des colonies ; GTP/GDP=guanosine tri- et diphosphate.

Source : D'après J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *ADN Recombinant*, 1ière éd. franç. Copyright ©1994 par De Boeck-Wesmael, S.A.

ACCUEIL CENTRAL UNIVERSITY

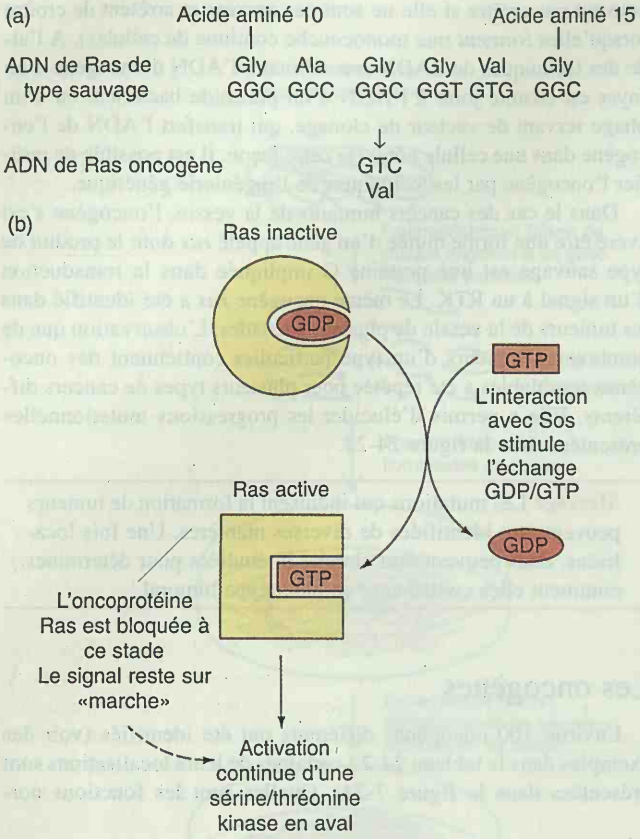


Figure 24-25. L'oncoprotéine Ras. (a) L'oncogène *ras* diffère du type sauvage par une seule base et produit une oncoprotéine Ras qui diffère de la protéine de type sauvage par un acide aminé à la position 12 du cadre de lecture *ras*. (b) L'effet de cette mutation faux-sens est de créer une oncoprotéine Ras qui ne peut pas hydrolyser le GTP en GDP (comparez avec le cycle Ras normal décrit dans la figure 24-18). En raison de cette défectuosité, l'oncoprotéine Ras reste sous la forme du complexe actif Ras-GTP et active en permanence la kinase sérine/thréonine située en aval (voir la figure 24-19).

males de leurs homologues cellulaires parfois appelés **proto-oncogènes** ? Les proto-oncogènes définissent en général une classe de protéines qui ne sont actives que lorsque le signal régulateur adéquat permet leur activation, habituellement par une interaction allostérique. En effet, les produits des proto-oncogènes sont souvent des éléments des voies de communication intercellulaire, c'est-à-dire des récepteurs de facteurs de croissance, des protéines de transduction de signal ou des facteurs de transcription. Toutefois, dans les mutations des oncogènes, l'activité de **l'oncoprotéine** mutante a été découplée de l'interaction régulatrice qui devrait normalement contrôler son activation en amont, ce qui aboutit à une expression permanente et non régulée de l'oncoprotéine (figure 24-25). Plusieurs catégories d'oncogènes correspondant à diverses manières de découpler les fonctions de régulation en amont ont été identifiées. Nous en examinerons quelques-unes.

Message Les oncogènes codent pour des oncoprotéines qui sont des formes altérées de protéines participant aux voies de communication intercellulaire qui contrôlent normalement la prolifération cellulaire.

Le passage d'une protéine normale à une oncoprotéine implique souvent des modifications structurales de la protéine elle-même, provoquées par une simple mutation ponctuelle. La substitution d'une seule paire de bases qui convertit une glycine en valine à la position 12 de la protéine Ras crée par exemple l'oncoprotéine présente dans le cancer humain de la vessie (figure 24-25a). Souvenez-vous que, comme nous l'avons vu plus haut dans ce chapitre, la protéine Ras normale est une sous-unité d'une protéine G impliquée dans une transduction de signaux qui fonctionne normalement de manière cyclique entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP (figure 24-18). Le changement d'acide aminé causé par la mutation faux-sens de l'oncogène *ras* produit une protéine qui lie toujours le GTP, même en absence du signal amont exigé par une protéine Ras de type sauvage. De cette façon, la protéine Ras émet en permanence un signal qui favorise la prolifération cellulaire.

Des altérations structurales peuvent aussi provenir de la délétion de parties d'une protéine. L'oncogène *v-erb* code pour une forme mutée d'un RTK connu sous le nom de EGFR, un récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF) (figure 24-26). La forme mutée de EGFR est dépourvue du domaine extracellulaire de liaison du ligand ainsi que de certains composants régulateurs du domaine cytoplasmique. Le résultat de ces délétions est que l'oncoprotéine tronquée EGFR v-erb est capable de se dimériser même en l'absence du ligand EGF. Le dimère constitutif de l'oncoprotéine EGFR est toujours autophosphorylé par son activité tyrosine kinase et amorce continuellement la cascade de transduction du signal.

Le type le plus remarquable d'oncoprotéine résultant d'une altération structurale est causé par une fusion de gènes. C'est le cas classique du chromosome de Philadelphie qui, comme nous l'avons déjà mentionné, résulte d'une translocation entre les chromosomes 9 et 22 qui sert de signe diagnostique pour la leucémie chronique myélogène (CML). Les méthodes de l'ADN recombinant ont montré que les points de rupture des translocations des chromosomes de Philadelphie sont très similaires chez différents malades atteints de CML et causent la fusion de deux gènes, *bcr1* et *abl* (figure 24-27). Le proto-oncogène *abl* code pour une protéine kinase cytoplasmique tyrosine-spécifique. L'oncoprotéine de fusion *bcr1-abl* est une protéine kinase activée qui est responsable de l'état oncogénique.

Certains oncogènes produisent une oncoprotéine qui est identique à la protéine normale par sa structure. Dans ce cas, la mutation oncogénique provoque une synthèse indue de la protéine dans des types cellulaires où la protéine est ordinairement absente. Plusieurs oncogènes qui induisent une expression anormale sont également associés à des translocations chromosomiques qui servent de diagnostic pour diverses tumeurs des lymphocytes B. (Rappelons, nous l'avons vu au chapitre 23, que les lymphocytes B et leurs descendants, les plasmocytes, sont les cellules qui synthétisent les anticorps ou immunoglobulines.) Dans les transloca-

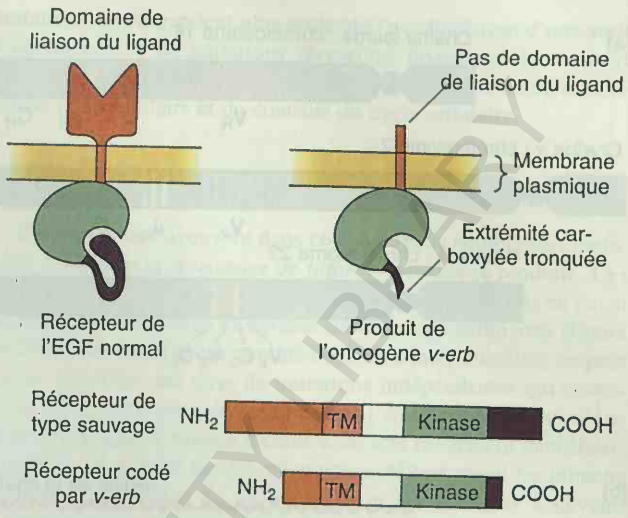


Figure 24-26. Une mutation oncogénique affectant la signalisation entre cellules. EGFR, le récepteur normal du facteur de croissance épidermique (EGF) possède un domaine de liaison du ligand à l'extérieur de la cellule, un domaine transmembranaire qui permet à la protéine de traverser la membrane plasmique et un domaine intracellulaire porteur d'une activité protéine kinase tyrosine-spécifique. Normalement, l'activité de kinase n'est activée que lorsque EGF se lie au domaine de liaison du ligand et cette activité n'est que transitoire. Le virus des tumeurs érythroblastiques porte l'oncogène *v-erbB* qui code pour une forme d'EGFR raccourcie à ses deux extrémités. Ces délétions aux deux extrémités permettent à la protéine de se dimériser de manière constitutive, résultant en une autophosphorylation continue et en la transduction permanente d'un signal à partir du récepteur. (Adapté de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *ADN Recombinant*, 1ière éd. franç. Copyright ©1994 par De Boeck-Wesmael, S.A.)

tions de ces lymphocytes, le réarrangement chromosomique ne produit pas de fusion de protéine mais active dans un tissu inadéquat un gène localisé à proximité d'un des points de rupture. Dans le lymphome de Burkitt, par exemple, une translocation joint le proto-oncogène *c-myc*, localisé sur le chromosome 8, et un des trois gènes qui codent pour les immunoglobulines *(Ig)*, et sont situés sur les chromosomes 2, 14 et 22, respectivement (figure 24-28). La protéine c-Myc est un facteur de transcription qui, dans de nombreux tissus, doit être activé pour induire la prolifération. La translocation *Ig-c-myc* place le gène *c-myc* très près d'un amplificateur (enhancer) tissu-spécifique d'un gène d'immunoglobuline qui d'ordinaire a pour fonction d'activer la transcription du gène *Ig*

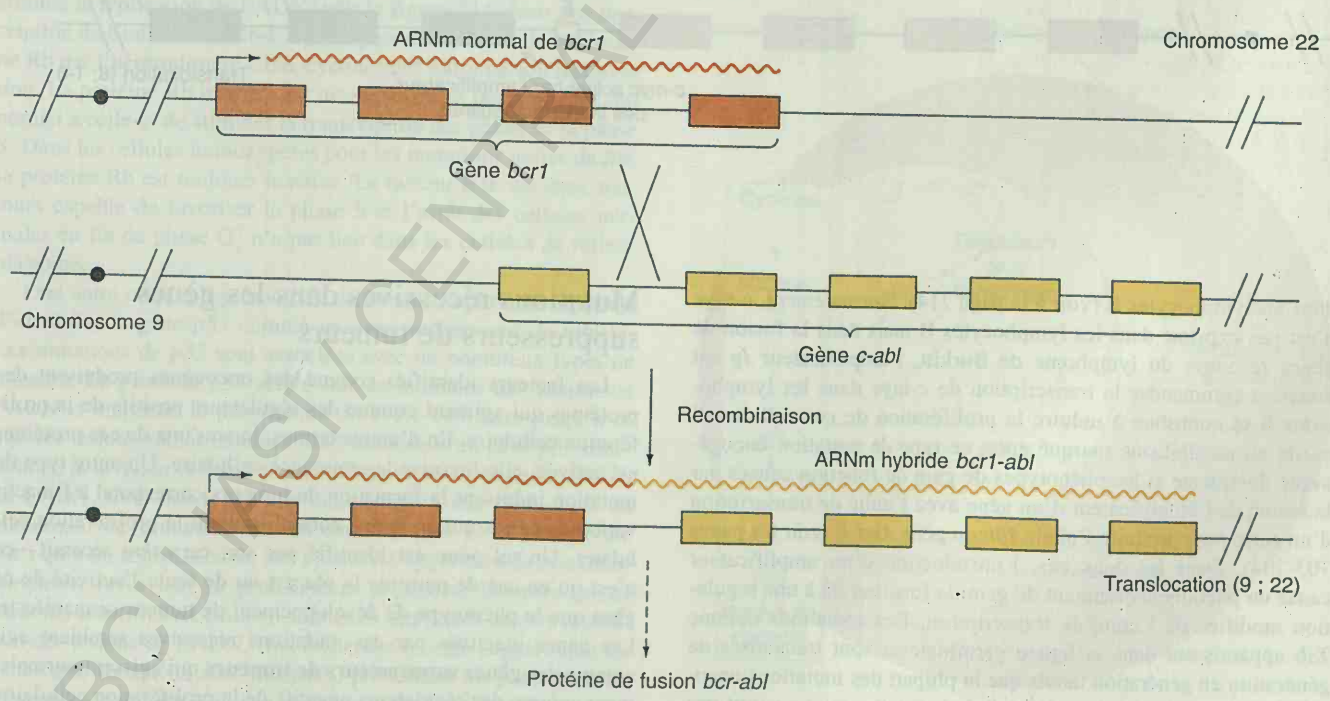


Figure 24-27. Le réarrangement chromosomique de CML. Le chromosome de Philadelphie qui sert de diagnostic pour le CML est une translocation entre les chromosomes 9 et 22. Les points de rupture de la translocation sont dans le gène *c-abl* qui code pour une protéine kinase cytoplasmique tyrosine-spécifique et dans le gène *bcr1* dont la fonction est inconnue. La translocation produit une protéine hybride bcr1-abl dépourvue des contrôles normaux qui réduisent l'activité protéine kinase tyrosine-spécifique. Un seul des deux chromosomes réarrangés provenant de la translocation réciproque est montré. (Adapté de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *ADN Recombinant*, 1ière éd. franç. Copyright ©1994 par De Boeck-Wesmael, S.A.)

BCU RSI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

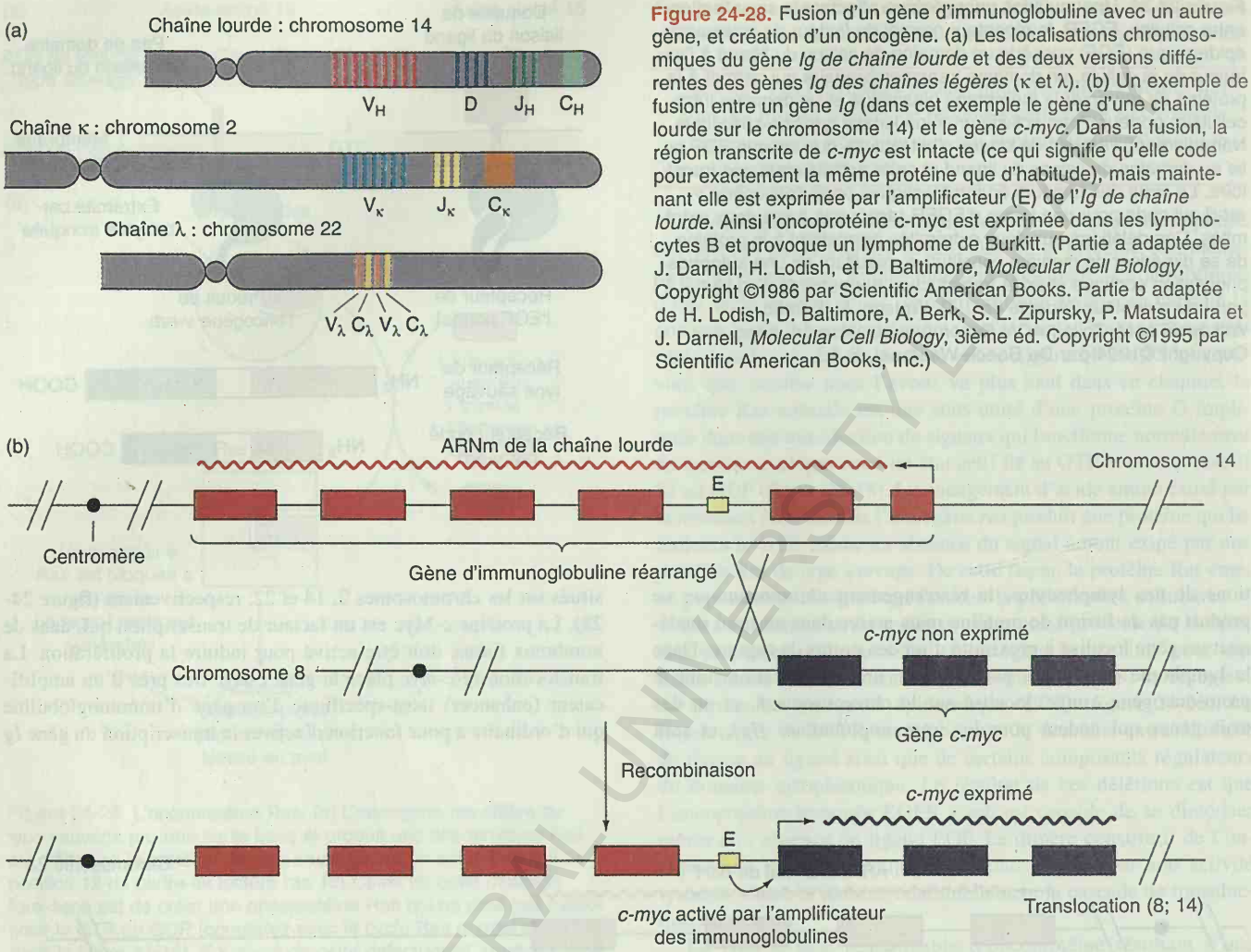


Figure 24-28. Fusion d'un gène d'immunoglobuline avec un autre gène, et création d'un oncogène. (a) Les localisations chromosomiques du gène *Ig de chaîne lourde* et des deux versions différentes des gènes *Ig des chaînes légères* (κ et λ). (b) Un exemple de fusion entre un gène *Ig* (dans cet exemple le gène d'une chaîne lourde sur le chromosome 14) et le gène *c-myc*. Dans la fusion, la région transcrite de *c-myc* est intacte (ce qui signifie qu'elle code pour exactement la même protéine que d'habitude), mais maintenant elle est exprimée par l'amplificateur (E) de l'*Ig de chaîne lourde*. Ainsi l'oncoprotéine c-myc est exprimée dans les lymphocytes B et provoque un lymphome de Burkitt. (Partie a adaptée de J. Darnell, H. Lodish, et D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*, Copyright ©1986 par Scientific American Books. Partie b adaptée de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Copyright ©1995 par Scientific American Books, Inc.)

dans les lymphocytes B (voir à la page 714). Normalement, c-myc n'est pas exprimé dans les lymphocytes B mais dans la fusion de gènes *Ig-c-myc* du lymphome de Burkitt, l'amplificateur *Ig* est amené à commander la transcription de c-myc dans les lymphocytes B et contribue à induire la prolifération de ces cellules. Il existe un parallélisme marqué entre ce type de mutation oncogénique dominante et les phénotypes de gain de fonction causés par la fusion de l'amplificateur d'un gène avec l'unité de transcription d'un autre pour produire l'allèle *Tab* du gène *Abd-B* (voir les pages 703-704). Dans les deux cas, l'introduction d'un amplificateur cause un phénotype dominant de gain de fonction dû à une régulation modifiée de l'unité de transcription. Des mutations comme *Tab* apparaissent dans la lignée germinale et sont transmises de génération en génération tandis que la plupart des mutations oncogéniques apparaissent dans des cellules somatiques et ne sont pas transmises à la descendance.

Message Les oncogènes dominants contribuent à l'état oncogénique en provoquant la synthèse d'une protéine sous une forme activée ou dans des cellules où elle n'est pas normalement synthétisée.

Mutations récessives dans les gènes suppresseurs de tumeurs

Les facteurs identifiés comme des oncogènes produisent des protéines qui agissent comme des régulateurs positifs de la prolifération cellulaire. En d'autres termes, lorsqu'une de ces protéines est activée, elle favorise la croissance cellulaire. Un autre type de mutation induisant la formation de tumeurs correspond à l'inactivation de gènes qui en temps normal limitent la prolifération cellulaire. Un tel gène est identifié par son caractère récessif—ce n'est qu'en cas de perte de la plupart ou de toute l'activité de ce gène que le phénotype de développement de tumeur se manifeste. Les gènes inactivés par ces mutations récessives semblent agir comme des **gènes suppresseurs de tumeurs** qui agissent normalement comme des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Ces gènes s'avèrent très nombreux et assurent des fonctions très diverses. Les plus importants qui ont été identifiés jusqu'à présent codent pour des régulateurs négatifs du cycle cellulaire. C'est le cas des gènes codant pour les protéines Rb et p53 qui, nous l'avons vu plus haut, sont des régulateurs importants du cycle cellulaire. Dans le rétinoblastome, un cancer qui affecte habituellement les

jeunes enfants (voir les pages 711 à 713), les cellules rétiniennes privées de gène *RB* fonctionnel prolifèrent de manière incontrôlée. Les cellules nulles pour *RB* sont soit homozygotes pour un seul allèle mutant de *RB* ou hétérozygotes pour deux mutations *RB* différentes. La plupart des malades sont atteints d'une ou d'un petit nombre de tumeurs localisées en un seul site d'un seul œil et la maladie est sporadique—en d'autres mots, il n'y pas eu de cas de rétinoblastome antérieurement dans la famille et l'individu atteint ne la transmet pas à sa descendance. Ceci provient de ce que la mutation *RB* ou les mutations *RB* qui inactivent les deux allèles de ce gène autosomique se produisent dans une cellule somatique dont les descendantes peuplent la rétine (voir la figure 7-25). Les mutations apparaissent probablement de manière aléatoire à différents moments du développement de la même lignée cellulaire.

Certains malades souffrent toutefois d'une forme héréditaire de la maladie, appelée *rétinoblastome héréditaire binoculaire* (HBR). Ces malades sont atteints de nombreuses tumeurs et les deux yeux sont touchés. Paradoxalement, bien que *RB* code pour un caractère récessif au niveau cellulaire, la maladie est transmise comme un caractère autosomique dominant (figure 7-25). Ce paradoxe n'en est plus un lorsqu'on réalise qu'en présence d'une mutation germinale qui inactive une des deux copies du gène *RB*, la fréquence de mutation de *RB* est telle qu'il est pratiquement sûr que certaines au moins des cellules rétiniennes des malades atteints de HBR auront acquis une mutation dans le gène *RB* restant, produisant ainsi des cellules sans gène *RB* fonctionnel.

Pourquoi l'absence de *RB* favorise-elle le développement de tumeurs ? Souvenez-vous qu'en discutant du cycle cellulaire nous avons vu que la protéine Rb agit en séquestrant le facteur de transcription E2F et l'empêche d'activer la transcription de gènes dont les produits sont nécessaires pour des fonctions de la phase S comme la réplication de l'ADN (voir la figure 24-9 pour une description de l'interaction Rb-E2F). La phosphorylation de la protéine Rb par l'hérérodimère CDK-cycline actif entraîne son inactivation. La protéine Rb inactive est incapable de se lier à E2F, ce qui permet à celle-ci de stimuler la transcription des gènes de la phase S. Dans les cellules homozygotes pour les mutations nulles de *RB*, la protéine Rb est toujours inactive. Le facteur E2F est donc toujours capable de favoriser la phase S et l'arrêt des cellules normales en fin de phase G_1 n'a pas lieu dans les cellules de rétinoblastome.

Une autre mutation promotrice de tumeur importante a permis d'identifier le gène *p53* comme un gène suppresseur de tumeur. Les mutations de *p53* sont associées avec de nombreux types de tumeurs. La protéine p53 active sert de moniteur des lésions de l'ADN et empêche la progression du cycle cellulaire jusqu'à ce que ces lésions soient réparées. En l'absence d'un gène *p53* fonctionnel, la division cellulaire a lieu même en absence de réparation de l'ADN. Ceci conduit à une augmentation des fréquences de mutations, de remaniements chromosomiques et d'aneuploïdie ainsi qu'à un accroissement des chances d'apparition de nouvelles mutations favorisant la prolifération cellulaire. D'autres gènes récessifs identifiés récemment sont aussi impliqués dans la réparation des lésions de l'ADN. Une recherche récente suggère que les gènes qui, lorsqu'ils sont inactivés, produisent un phénotype de fréquence de mutation élevée contribuent de manière importante à la progression des tumeurs chez l'homme. Ces mutations récessives qui interfèrent avec la réparation de l'ADN favorisent indirectement la croissance des tumeurs parce que leurs fréquences de mutation élevées rendent plus probable l'accumulation d'une série d'oncogènes et de mutations récessives favorisant les tumeurs dans des gènes codant pour des protéines des trajets de communication intercellulaire et de contrôle du cycle cellulaire.

La complexité du cancer

Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, de nombreuses mutations favorisant la croissance de tumeurs peuvent se produire. Ces mutations sont apparentées sur le plan du mécanisme mis en jeu et peuvent être comprises en termes de fonctions cellulaires (figure 24-29). Dans certains cas comme celui du cancer du côlon, on peut même identifier une série de mutations indépendantes qui contribuent à la progression de la cellule de l'état normal à celui d'une tumeur bénigne et ensuite à celui d'un état réellement cancéreux. L'histoire ne s'arrête pas ici, néanmoins. Même parmi les tumeurs malignes, les vitesse de prolifération et les aptitudes à envahir d'autres tissus—c'est-à-dire à créer des métastases—sont très différentes. Même lorsque l'état tumoral est atteint, d'autres mutations qui facilitent la prolifération et l'envahissement s'accumulent dans les cellules de la tumeur. Il y a donc encore beaucoup à faire avant de vraiment comprendre comment les tumeurs apparaissent et se développent.

Message Certaines mutations récessives qui contribuent à la formation de tumeurs inactivent des gènes suppresseurs de tumeurs dont la fonction normale est d'inhiber la prolifération cellulaire.

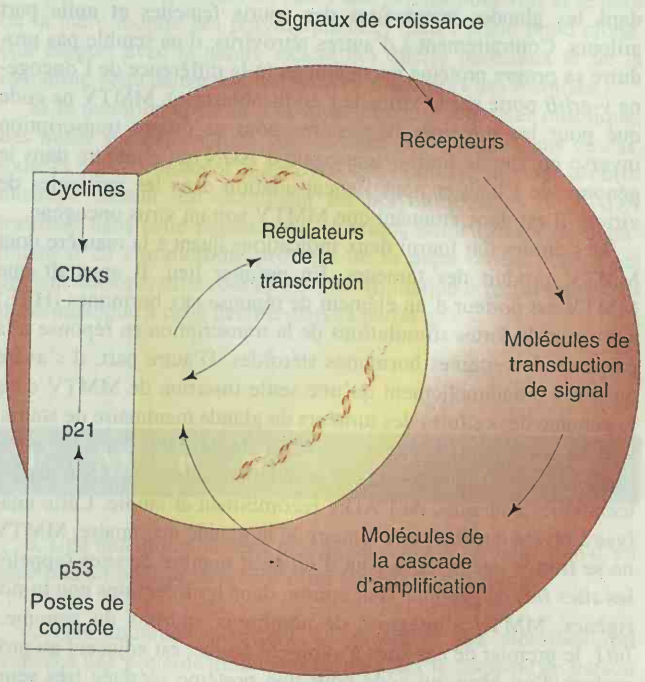


Figure 24-29. Les types de molécules qui contrôlent la prolifération cellulaire et sont altérés par des mutations qui induisent les tumeurs. (Adapté de A. Kamb, *Trends in Genetics* 11, 1995, 138.)

RÉSUMÉ

Les cellules d'eucaryotes supérieurs ont développé des mécanismes précis pour contrôler leur structure et leur aptitude à proliférer. Ces contrôles sont fortement intégrés et dépendent d'une évaluation permanente de l'état de la cellule et de la communication continuelle d'informations aux cellules voisines ainsi qu'entre les différents tissus. Les oncogènes codent pour les oncoprotéines, des formes activées de protéines impliquées dans les voies de communication intercellulaire ; ceci entraîne l'activation permanente de facteurs de transcription dont le rôle est d'induire la prolifération cellulaire. Des mutations récessives dans des gènes suppresseurs de tumeurs favorisent le développement de celles-ci en inactivant des protéines dont le rôle normal est d'inhiber la progression dans le cycle cellulaire ou en augmentant d'une manière générale la fréquence des mutations dans la cellule.

Diagramme conceptuel

Dressez un diagramme conceptuel reliant autant des termes suivants que possible. Notez qu'ils ne sont présentés dans aucun ordre particulier.

facteurs de transcription / amplificateur / oncogène / mutations de gain de fonction / protéine kinase cycline-dépendante / microtubules / postes de contrôle / trajet de transduction de signal / prolifération cellulaire / RTK / gène suppresseur de tumeur

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Le virus des tumeurs mammaires des souris, MMTV, est un rétrovirus oncogénique. Il provoque spécifiquement des tumeurs dans les glandes mammaires des souris femelles et nulle part ailleurs. Contrairement à d'autres rétrovirus, il ne semble pas produire sa propre protéine oncogénique (à la différence de l'oncogène *v-erbB* porté par le virus de l'érythroblastose). MMTV ne code que pour les protéines nécessaires pour sa propre transcription inverse en vue de fournir une copie d'ADN qui s'intègre dans le génome de l'hôte et pour l'encapsidation dans les particules de virion. Il est donc étonnant que MMTV soit un virus oncogène.

Des études ont fourni deux indications quant à la manière dont MMTV produit des tumeurs. En premier lieu, il apparaît que MMTV est porteur d'un élément de réponse aux hormones (HRE) qui cause de fortes stimulations de la transcription en réponse à la présence de certaines hormones stéroïdes. D'autre part, il s'avère qu'il n'y a habituellement qu'une seule insertion de MMTV dans le génome des cellules des tumeurs de glande mammaire de souris. L'ADN encadrant le site d'insertion de MMTV dans de nombreuses tumeurs induites de façon indépendante a été cloné par les techniques courantes de l'ADN recombinant et étudié. Cette analyse a révélé que dans une tumeur de la glande mammaire, MMTV ne se trouve intégré qu'à côté d'un petit nombre de sites (appelés les *sites Int*) du génome. (Par contre, dans les infections non tumorigènes, MMTV s'intègre à de nombreux endroits du gènome.) *Int1*, le premier de ces sites à avoir été étudié, est adjacent au promoteur d'un gène qui code pour une protéine sécrétée très semblable à la protéine *wg* de la drosophile qui est impliquée dans la signalisation intercellulaire au cours de la segmentation de l'embryon.

a. Sachant que le développement des glandes mammaires et la lactation dépendent de certains signaux hormonaux stéroïdes femelles-spécifiques et sont liés aux indices que nous venons de discuter, proposez une explication pour la manière dont MMTV produit ses effets oncogéniques.

b. Proposez une démarche expérimentale pour tester cette hypothèse.

Solution

a. A cause de l'élément HRE qu'il porte, MMTV agit comme un élément amplificateur mobile. Le récepteur des hormones stéroïdes auquel HRE répond n'est probablement exprimé que dans les glandes mammaires, de telle sorte que HRE est un amplificateur tissu-spécifique pour ces glandes. Ainsi, si le MMTV s'intègre près d'un gène qui, lorsqu'il est activé dans les glandes mammaires femelles, lève la régulation de la prolifération cellulaire, il est capable de causer une tumeur. Dans le cas de *Int1*, par exemple, la protéine n'est pas normalement exprimée dans les glandes mammaires mais peut le devenir à un niveau élevé sous l'influence du HRE de MMTV. En principe donc, ceci n'est pas différent d'un oncogène dominant résultant de remaniements chromosomiques, comme dans le lymphome de Burkitt où un amplificateur *Ig* est fusionné avec le gène *c-myc* et active *c-myc* dans les lymphocytes B. Dans le cas de MMTV, toutefois, une insertion virale au lieu d'une translocation chromosomique est responsable de la fusion.

b. Cette hypothèse postule que le HRE est la seule portion essentielle de MMTV en rapport avec l'oncogénèse et qu'il agit via

une régulation anormale du gène *Int1*. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions isoler un petit segment d'ADN qui ne comporte que l'HRE de MMTV et le fusionner in vitro avec un gène *Int1* de type sauvage. Nous pourrions ensuite injecter directement cet ADN dans des blastocystes de souris et l'intégrer au hasard dans le génome par transformation de la lignée germinale Notre prévision serait que chacune de ces insertions chez des femelles devrait causer des tumeurs de la glande mammaire. Nous devrions aussi inclure deux constructions à titre de témoins : d'abord, la transformation de la lignée germinale par une construction similaire où nous placerions une mutation non-sens dans la séquence codante de *Int1* de manière à ce que la protéine soit inactive ; ensuite, dans une autre construction, nous muterions le HRE de manière à ce qu'il ne puisse plus se lier au récepteur des stéroïdes. Aucune de ces deux constructions ne devrait être oncogénique.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Dans la forme héréditaire du rétinoblastome, un enfant atteint est hétérozygote pour une mutation *RB* qui lui a été transmise par un de ses parents ou est survenue dans le noyau soit du spermatozoïde, soit de l'ovocyte qui a donné naissance à l'enfant. Pourtant, les cellules hétérozygotes $RBRB^+$ ne sont pas malignes. L'allèle RB^+ de l'hétérozygote doit également être inactivé dans le tissu rétinal en cours de développement pour créer une cellule tumorale. Une telle inactivation peut avoir lieu suite à une mutation indépendante de l'allèle RB^+ ou suite à un crossing-over mitotique qui ferait que la mutation *RB* originale soit à présent homozygote.

a. Si un rétinoblastome est également transmis à d'autres enfants des mêmes parents, pouvons-nous déterminer si la mutation originale provient de la mère ou du père ? Comment ?

b. Au cas où elle est apparue de novo dans une cellule germinale d'un des parents, pouvons-nous déterminer de quel parent la mutation *RB* provient ?

Solution

a. Si le caractère a été hérité, nous pouvons déterminer de quel parent il provient. La démarche la plus directe consiste à identifier les polymorphismes de l'ADN tels que les polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP ; chapitre 15) localisés dans ou près du gène *RB*. Celui-ci a la curieuse propriété de se transmettre comme un caractère autosomique dominant, même s'il est récessif sur une base cellulaire. Etant donné le profil de transmission dominant, il devrait être possible de déterminer quel allèle est transmis à tous les individus atteints en identifiant dans les génomes parentaux les différences de l'ADN qui sont localisées à proximité des quatre allèles parentaux. Cet allèle serait celui qui a été muté.

b. Si le caractère est apparu de novo dans le spermatozoïde ou dans l'ovocyte, il est encore possible de déterminer de quel parent il provient, mais avec de considérables difficultés. Une façon de faire ceci consiste à utiliser les techniques de clonage de l'ADN recombinant pour isoler chacune des deux copies du gène *RB* des cellules normales. Un seul de ces allèles devrait être muté. Une fois ce gène cloné, le séquençage de l'ADN des deux allèles permettrait d'identifier la mutation qui inactive *RB*. Puisqu'elle est apparue dans le spermatozoïde ou dans l'ovocyte, cette mutation ne sera pas présente dans les cellules somatiques des parents. Si le séquençage révèle aussi des polymorphismes (par exemple dans les sites de restriction) qui permettent de distinguer les allèles, il devrait être possible de remonter à l'ADN des parents pour voir si le père ou la mère montre des polymorphismes dans l'allèle muté cloné. (En rapport avec la nature exacte des allèles parentaux et de la mutation, cette démarche ne fournit pas toujours des résultats.)

Si la mutation apparaît à la suite d'un crossing-over mitotique, des outils supplémentaires sont à notre disposition. Dans ce cas, toute la région entourant le gène *RB* sera homozygote pour le chromosome mutant. En examinant les polymorphismes de l'ADN localisés dans cette région, nous devrions être capables de déterminer si ce chromosome provient de la mère ou du père. Ceci devient une opération courante de détermination d'empreinte génétique analogue à celle décrite dans la partie a.

PROBLÈMES

1. On suppose que le cancer résulte de l'accumulation de deux ou plusieurs mutations affectant la prolifération ou la régulation de la même cellule. Beaucoup de ces mutations oncogéniques sont dominantes : une seule copie mutée du gène approprié suffit à changer les propriétés de prolifération de la cellule. Lesquels parmi les types généraux de mutations suivants pourraient d'être des oncogènes dominants ? Justifier chaque réponse.

a. Une mutation qui accroît le nombre de copies d'un facteur de transcription

b. Une mutation non-sens proche du début de la traduction d'un gène codant pour le récepteur d'un facteur de croissance

c. Une mutation affectant un récepteur des stéroïdes qui empêche une protéine inhibitrice de masquer le domaine de liaison à l'ADN du récepteur

d. Une mutation qui endommage le site actif d'une protéine kinase cytoplasmique tyrosine-spécifique

2. La preuve que les tumeurs proviennent d'une seule cellule

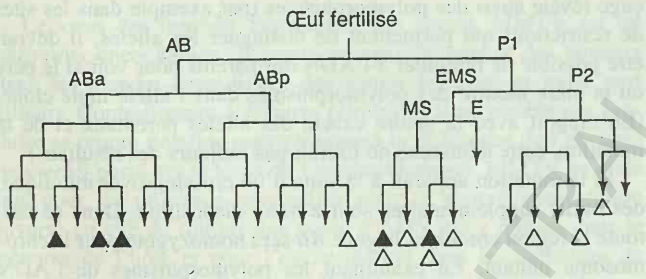
repose en partie sur le phénomène de compensation de dose chez l'homme. Expliquez comment la compensation de dose a contribué à démontrer la nature clonale des tumeurs.

3. Au cours du développement de la vulve de *C. elegans*, une cellule d'ancrage de la gonade interagit avec les six cellules d'un groupe d'équivalence (des cellules qui ont la possibilité de devenir des parties de la vulve). Les six cellules du groupe d'équivalence connaissent trois destinées phénotypiques différentes, celles de cellules primaires, secondaires et tertiaires. Les cellules les plus proches de la cellule d'ancrage développent le phénotype de cellules vulvaires primaires. Si l'on élimine la cellule d'ancrage, les six lignées issues du groupe d'équivalence évoluent vers l'état tertiaire.

a. Formulez un modèle qui explique ces résultats.

b. La cellule d'ancrage et les six cellules du groupe d'équivalence peuvent être isolées et cultivées in vitro ; imaginez une expérience permettant d'éprouver ce modèle.

4. Il existe deux types de cellules musculaires chez *C. elegans* : celui des muscles pharyngiens et celui des muscles de l'enveloppe corporelle. Ces cellules peuvent être distinguées les unes des autres même lorsqu'elles sont isolées. Dans le schéma ci-dessous, les lettres désignent les cellules qui jouent le rôle de précurseur d'un muscle particulier ; les triangles noirs (▲) sont des muscles pharyngiens et les triangles blancs (Δ) des muscles d'enveloppe corporelle.



a. Il est possible de déplacer les cellules au cours du développement. Lorsque les cellules ABa et ABp sont substituées physiquement, les cellules se développent en concordance avec leur nouvelle position. En d'autres termes, la cellule qui était initialement à la position ABa donne naissance à une cellule de muscle d'enveloppe corporelle, tandis que la cellule qui était à la position ABp donne maintenant lieu à trois cellules de muscle pharyngien. Que suggèrent-ces résultats quant au processus qui contrôle les destinées de ABa et ABp ?

b. Si EMS est éliminé (par inactivation thermique avec un rayon laser pointé à travers une lentille de microscope), aucun dérivé d'AB ne développe de muscle. Que suggère cette observation ?

c. Si P2 est éliminé, les dérivés de AB deviennent des cellules de muscles. Que signifie ce résultat ?

(Figure de J. Priess et N. Thomson, *Cell* 48, 1987, 241.)

5. Certains gènes peuvent être mutés et devenir des oncogènes en augmentant le nombre de copies du gène. Ceci est vrai, par exemple, pour le facteur de transcription *c-myc*. D'autre part, les mutations oncogéniques de *ras* sont toujours des mutations ponctuelles qui altèrent la structure de la protéine Ras. Trouvez une explication logique en termes des rôles des versions normales et oncogéniques de *ras* et *myc* pour ces observations.

6. Chez l'homme, la testostérone, une hormone stéroïde mâle, se lie au récepteur de la testostérone. Le complexe hormone-récepteur active ensuite la transcription de gènes mâle-spécifiques. Une mutation dans le récepteur de la testostérone empêche la liaison de celle-ci. Quel serait le phénotype d'un individu qui est XY et homozygote pour une telle mutation ? Justifiez votre conclusion en termes du mode d'action du récepteur des stéroïdes.

7. Supposez que vous ayez la possibilité d'introduire des copies normales d'un gène dans une cellule de tumeur possédant dans le gène des mutations qui ont favorisé le développement de tumeurs.

a. Si les mutations se trouvaient dans un gène récessif suppresseur de tumeurs, vous attendez-vous à ce que ces transgènes normaux bloquent l'activité inductrice de tumeurs des mutations ? Justifiez votre réponse.

b. Si les mutations étaient du type oncogène dominant, vous attendriez-vous à ce que les transgènes normaux bloquent leurs activités inductrices de tumeurs ? Justifiez votre réponse.

8. L'insuline est une protéine sécrétée par le pancréas (un organe endocrine) lorsque le taux de sucre est élevé dans le sang. L'insuline agit sur de nombreux tissus distants en se liant à un récepteur à tyrosine kinase et en l'activant, ce qui conduit à une réduction du sucre sanguin et à la mise en réserve des produits du métabolisme des sucres.

Le diabète est une maladie dans laquelle le taux de sucre sanguin reste élevé parce que certains éléments de la voie de l'insuline sont défectueux. Un des types de diabète (appelons le de type A) peut être traité en administrant de l'insuline au malade. Un autre type de diabète (le type B) n'est pas atténué par le traitement à l'insuline.

a. Lequel de ces diabètes est probablement dû à un défaut du pancréas et lequel est probablement dû à un défaut des cellules cibles ? Justifiez votre réponse.

b. Le diabète de type B peut être dû à des mutations dans de nombreux gènes différents. Expliquez cette observation.

9. L'épinéphrine (adrénaline), une hormone sécrétée par la glande médullo-surrénale, se lie au récepteur β-adrénergique et l'active. Ceci entraîne l'activation de l'adénylate cyclase qui, à son tour, mène à la production de niveaux élevés d'AMP cyclique (AMPc). L'AMPc se lie alors à la sous-unité régulatrice d'une protéine kinase AMPc-dépendante (CPK). Cette liaison permet à la sous-unité régulatrice de se dissocier de la sous-unité catalytique et à cette dernière de phosphoryler son substrat protéique. Quels seraient les effets de la CPK sur des cellules cibles possédant les génotypes suivants ? Justifiez vos réponses.

a. L'homozygotie pour une mutation qui conduit à la production constitutive de l'épinéphrine par la glande médullo-surrénale

b. L'homozygotie pour une mutation qui détruit le site actif de l'adénylate cyclase

c. L'homozygotie pour une mutation dans la sous-unité régulatrice de la CPK qui empêche la liaison de l'AMPc

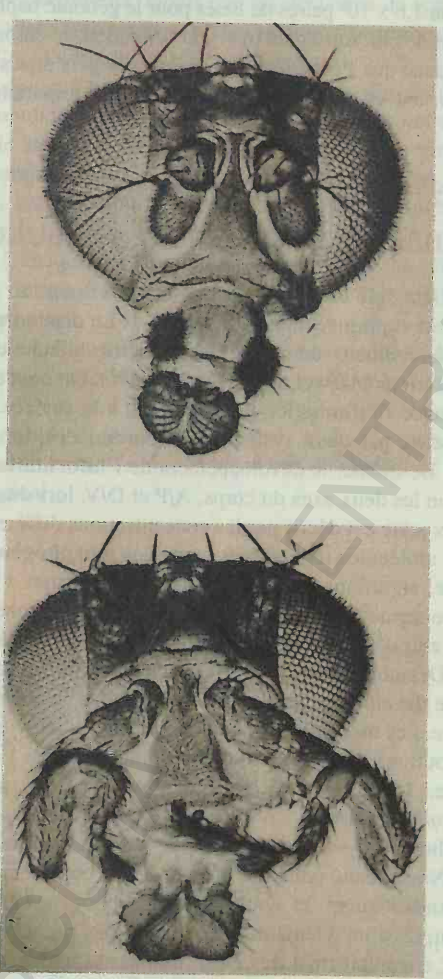
d. La double homozygotie pour les mutations en (a) *et* (b)

e. La double homozygotie pour les mutations en (b) *et* (c)

CHAPITRE

25

La génétique du développement : le devenir de la cellule et la formation des plans d'ébauche



Une mutation homéotique qui altère le plan corporel de base chez *Drosophila*. L'homéose est le remplacement d'une partie du corps par une autre. A la place des antennes normales (en haut), une mutation *Antennapedia* provoque le développement de pattes. (F. R. Turner / BPS

CONCEPTS-CLÉS

- Un ensemble d'instructions programmées dans le génome des organismes supérieurs, décide du futur des cellules en concordance avec le plan de développement de l'individu.
- Le zygote est *totipotent puisqu'il* donne naissance à toutes les cellules de l'adulte; au cours du développement les décisions successives restreignent chaque lignée de cellules à son devenir particulier.
- Les gradients de protéines régulatrices maternelles établissent une polarité le long de l'axe majeur de l'oeuf; ces protéines contrôlent localement l'activité transcriptionelle de gènes codant pour des protéines régulatrices essentielles dans le zygote.
- De nombreuses protéines agissant comme régulateurs principaux du développement précoce sont des facteurs de transcription; d'autres sont des éléments qui interviennent dans la transmission de signaux entre les cellules.
- Certaines décisions concernant le devenir des cellules sont prises de manière autonome par les cellules individuelles; beaucoup de ces décisions exigent la communication et la collaboration entre cellules.
- Le même groupe de gènes fondamentaux, identifiés dans *Drosophila*, ainsi que les protéines régulatrices qu'ils codent, sont conservés chez les mammifères et gouvernent les étapes majeures du développement dans beaucoup, sinon tous les animaux supérieurs.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Chez tous les organismes supérieurs, la vie commence par une cellule unique, l'oeuf nouvellement fertilisé. A la maturité ce sont des milliers, voire des millions ou même des trillions de cellules qui se retrouvent associées en un organisme complexe formé de nombreux organes intégrés en systèmes. Le but de la biologie du développement est d'élucider les processus fascinants et mystérieux qui permettent la transformation de l'oeuf en adulte. Nos connaissances étant plus développées au sujet du processus complexe de formation des animaux, nous restreindrons l'essentiel de notre discussion au développement de ces organismes.

Le plan général du corps est commun à tous les membres d'une espèce, et de plus commun à de nombreuses espèces différentes. Tous les mammifères ont quatre membres, tous les insectes six. Mais les mammifères et les insectes doivent tous, pendant leur développement, différencier les extrémités antérieures des postérieurs et la face dorsale de la ventrale. Les yeux et les membres apparaissent toujours à l'endroit adéquat et, ceci indépendamment des variations de l'environnement excepté dans les cas de troubles sévères interférant avec le développement. L'étude du plan global de développement du corps peut donc être menée en étudiant le programme génétique interne de l'organisme sans références à l'environnement. Nous n'oublierons cependant pas que l'étude du déterminisme génétique de ces processus globaux du développement ne nous fournira pas une explication des différences phénotypiques entre individus d'une espèce. Ce chapitre sera focalisé sur les processus sous-tendant la formation des plans d'ébauche, la construction de formes complexes et sur la fiabilité de ces processus.

Durant le développement de ce plan, les cellules adoptent des **destinées cellulaires** spécifiques, c'est-à-dire la capacité de se différencier en types particuliers de cellules. Le processus de l'engagement vers un devenir particulier, la **détermination**, est graduel. Une cellule ne se transforme pas directement d'un état encore *totipotent* en un état spécialisé. Au contraire, lorsque les cellules prolifèrent dans l'organisme en développement des *décisions* sont prises pour spécifier de plus en plus précisément les options futures des cellules d'une lignée donnée. La plupart de telles déterminations sont des décisions collectives - c'est-à-dire que le devenir d'une cellule dépend de messages provenant des cellules voisines. Autrement dit, pour construire un organisme complet, les cellules doivent prendre des directions de développement dans le contexte de celles prises par leurs voisines.

Dans ce chapitre, nous dissèquerons génétiquement plusieurs exemples de destins cellulaires. Si ce chapitre avait été écrit il y a 15 ans, nous nous serions satisfaits de la description phénoménologique de mutants et par des manipulations microchirurgicales d'embryons. Il n'en est plus de même aujourd'hui. La combinaison de la génétique et des techniques de l'ADN recombinants ont révolutionné notre compréhension du développement. Nous avons maintenant la possibilité d'identifier les protéines contribuant aux étapes de ce développement et de construire un schéma général des mécanismes moléculaires impliqués. Ce qui est singulièrement passionnant c'est que les techniques de l'ADN recombinant permettent aux chercheurs de retrouver des gènes homologues chez des organismes très différents. En suivant de telles approches nous commençons à réaliser que le même ensemble de protéines régulatrices de base -y compris certaines classes de facteurs de transcription et de molécules véhiculant l'information entre cellules- gouverne les événements majeurs du développement chez tous les animaux supérieurs.

Formation de plans d'ébauche : l'établissement du plan corporel de base chez l'animal.

Comme pour d'autres phénomènes biologiques, certains systèmes sont plus favorables que d'autres pour étudier l'élaboration des plans d'ébauches. En effet, beaucoup de progrès dans la connaissances du développement animal, proviennent de l'étude de deux petits invertébrés : *Drosophila melanogaster* (la mouche du vinaigre et des fruits) et *Caenorhabditis elegans* (un ver nématode). Ce que nous avons appris dans ces systèmes nous fournit une base pour examiner des problèmes de développement similaires chez d'autres animaux.

L'information la plus révélatrice au sujet du développement précoce provient des études chez *Drosophila*. Il y a de nombreuses raisons pour lesquelles l'étude de cette mouche s'est avérée si fructueuse. Sa facilité d'élevage, son temps de génération court, son petit génome (environ $1{,}6 \times 10^8$ paires de bases pour le génome haploïde), son petit nombre de chromosomes (n=4), la formation de chromosomes polytènes, ainsi que l'accumulation de données génétiques sur plus de 85 ans, en sont les avantages génétiques les plus importants.

Une brève introduction à la formation des plans d'ébauche.

La stratégie essentielle pour l'établissement du plan global du corps est expliquée dans la figure 25-1. Le plan corporel de la plupart des animaux comporte une symétrie bilatérale, un axe antéro/postérieur (A/P) et dorso-ventral (D/V). On peut établir une analogie avec l'information géographique à la surface de la terre qui est décrite par deux systèmes de coordonnées, longitudes et latitudes. De même, le développement de **l'information positionnelle** selon les deux axes du corps, A/P et D/V, lors du développement de l'ovocyte est décrit par les concentrations différentielles de certaines molécules régulatrices (appelées **morphogènes**, de morphogénèse, signifiant « développements des formes »). Nous utiliserons le terme morphogène pour désigner une molécule contrôlant le devenir d'une cellule selon un mode dépendant de sa concentration. Des concentrations différentes d'un morphogène détermineront le devenir des cellules. D'une certaine manière, durant l'ovogénèse, des mécanismes doivent être mis en oeuvre pour créer des distributions asymétriques de morphogènes dans l'ovocyte unicellulaire. Dans les cas les mieux compris, en particulier chez *Drosophila* (discuté ci-après) les distributions asymétriques des morphogènes sont réalisées par le transport et l'ancrage de l'ARNm codant pour les morphogènes eux-mêmes ou pour des protéines régulant la synthèse des morphogènes à l'une ou l'autre extrémité d'un élément cytosquelettique polarisé (voir chapitre 24). Le résultat final de ce processus est que les cellules de l'embryon précoce sont exposées à des niveaux différents de morphogènes le long de chacun des axes et s'engagent ainsi dans différentes voies de développement.

Plusieurs morphogènes peuvent être présents à des concentrations différentes dans l'embryon précoce, mais les cellules embryonnaires ne semblent capables de percevoir qu'un nombre limité d'échelles de concentrations. La conséquence de ceci est que l'embryon précoce est divisé en un petit nombre de domaines distincts, l'expression de différentes molécules régulatrices au long de chaque axe étant caractéristique de chaque domaine. Une fois ces domaines définis, les cellules ne sont plus totipotentes; elles commencent le processus qui les restreindra à un devenir spécifique.

Cette restriction résulte d'une série d'étapes spécifiques, au cours desquelles l'attribution aux cellules d'un devenir propre est coordonnée grâce à des interactions entre cellules. Grâce aux interactions inductives entre différentes populations de cellules et grâce à la communication des décisions prises, chaque domaine coordonne le processus de spécification du développement de telle sorte qu'un nombre suffisant de cellules soit assigné à chaque type cellulaire. Certaines interactions sont positives, de sorte qu'une cellule induit d'autre cellules a adopter un destin particulier, alors que d'autres interactions sont négatives de sorte qu'une cellule d'un type particulier empêche les cellules voisines de s'engager dans une voie identique. Chez les animaux supérieurs, les décisions du type A/P conduisent à la production d'unités tissulaires répétées appelées **segments**, tandis que les décisions de type D/V distinguent les types cellulaires au sein d'un domaine (par exemple les neurones, l'épiderme, les muscles et l'intestin).

L'élégance de cette approche qui consiste à diviser progressivement une population de cellules en plusieurs types cellulaires organisés réside dans sa flexibilité. Comme les décisions sont progressives et comme beaucoup d'entre elles sont collectives c'est-à-dire formées par interaction d'information entre cellules voisines, il n'est pas très important qu'un nombre exact de cellules soient assigné à chaque domaine initial. Les interactions cellules-cellules durant l'étape d'affinage garantissent un nombre suffisant dans chaque domaine.

Un autre fait à garder en mémoire est qu'à chaque étape du processus du mode de formation, un gène régulateur exprimé dans un domaine particulier active d'autres gènes régulateurs dans différents sous-ensembles de ce domaine. Ainsi, à chaque étape sont réalisées des subdivisions de plus en plus fines du **champ de développement** original.

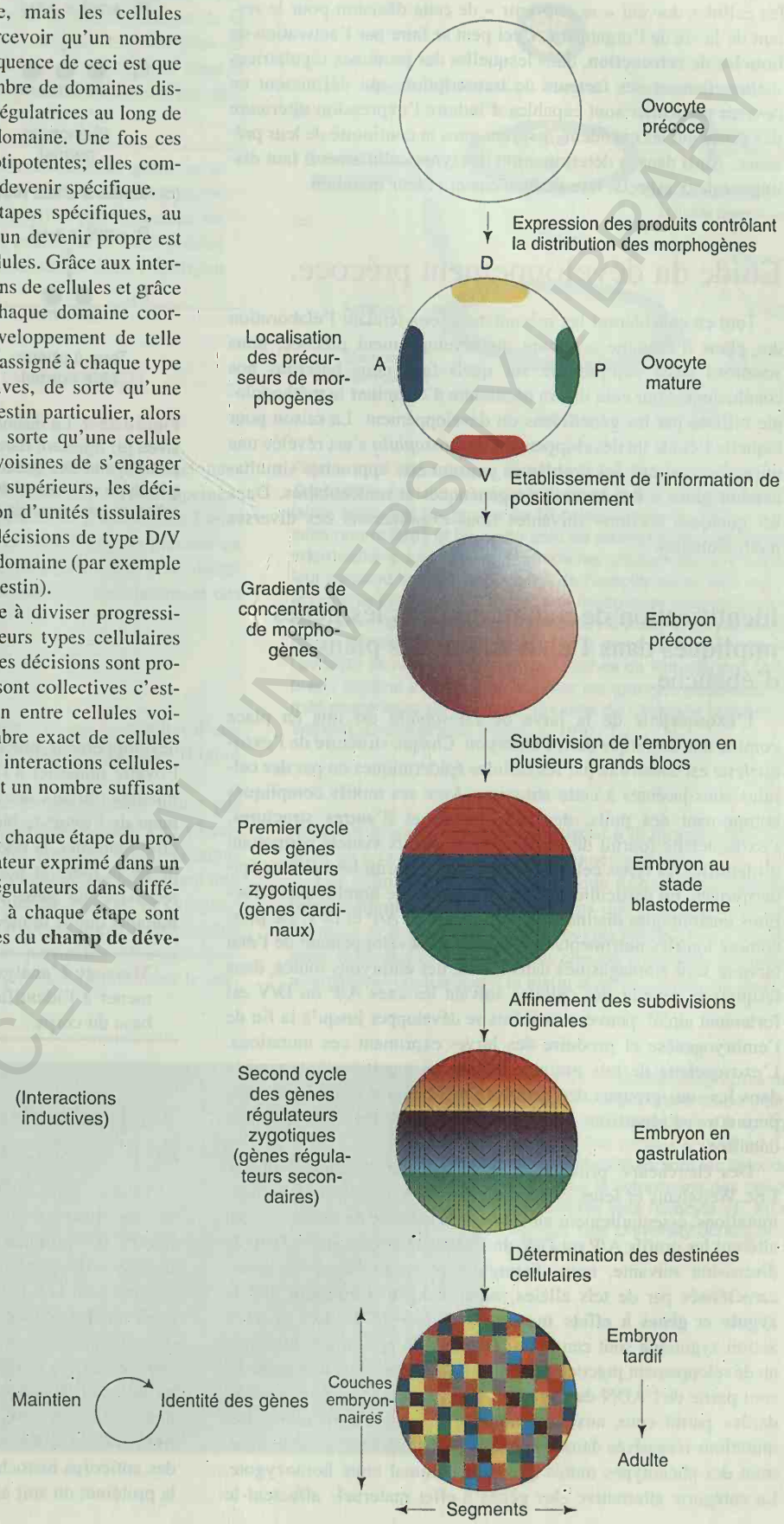


Figure 25-1. Les étapes conduisant à l'établissement du plan corporel de base. La localisation des précurseurs de morphogènes (voir texte) aux pôles de l'embryon détermine les conditions de l'établissement des gradients de morphogènes. A différents niveaux de concentration, les morphogènes activent différents gènes primaires, régulateurs actifs dans le zygote, qui divisent l'embryon en plusieurs domaines assez étendus. Les domaines d'expression de ces gènes régulateurs primaires subdivisent l'embryon en domaines plus réduits, chacun porteur d'une destinée cellulaire différente. L'activation et le maintien des gènes de l'identité cellulaire permettent aux cellules de conserver cette identité pendant le restant du développement.

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dans de nombreux cas, une fois les devenirs cellulaires établis, les cellules doivent « se souvenir » de cette décision pour le restant de la vie de l'organisme. Ceci peut se faire par l'activation de **boucles de rétroaction**, dans lesquelles des protéines régulatrices -habituellement des facteurs de transcription- qui définissent un devenir particulier sont capables d'induire l'expression ultérieure des gènes qui les encodent, assurant ainsi la continuité de leur présence. Ainsi dans la détermination des types cellulaires il faut distinguer deux aspects, leur établissement et leur maintien.

Etude du développement précoce.

Tout en considérant les mécanismes sous-tendant l'élaboration des plans d'ébauche au cours du développement précoce, nous voudrons aussi comprendre sur quels faits nous baserons nos conclusions. Pour cela il sera nécessaire d'examiner la méthodologie utilisée par les généticiens du développement. La raison pour laquelle l'étude du développement de *Drosophila* s'est révélée une mine d'or, est que les problèmes peuvent être approchés simultanément grâce à des techniques génétiques et moléculaires. Dans les quelques sections suivantes nous examinerons ces diverses méthodologies.

Identification de mutations dans les gènes impliqués dans l'élaboration des plans d'ébauche.

L'exosquelette de la larve de *Drosophila* est mis en place comme une mosaïque dans l'embryon. Chaque structure de l'exosquelette est construite par les cellules épidermiques ou par des cellules sous-jacentes à cette structure. Avec ses motifs compliqués comprenant des poils, des indentations et d'autres structures, l'exosquelette fournit de nombreux marqueurs visuels permettant d'identifier les types cellulaires déterminés parmi les cellules épidermiques. En particulier on peut distinguer de nombreuses structures anatomiques distinctes le long des axes A/P et D/V. De plus, comme tous les nutriments nécessaires au développement de l'état larvaire sont emmagasinés dans l'oeuf, des embryons mutés, dans lesquels le devenir des cellules suivant les axes A/P ou D/V est fortement altéré, peuvent toutefois se développer jusqu'à la fin de l'embryogenèse et produire des larves exprimant ces mutations. L'exosquelette de tels mutants reflète les mutations intervenues dans les sous-groupes des cellules épidermiques et peuvent donc permettre d'identifier des gènes dignes d'une analyse plus détaillée.

Des chercheurs, principalement Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Weischaus et leurs collègues, ont criblé de très nombreuses mutations, essentiellement en saturant le génome de mutations qui altèrent les profils A/P ou D/V de l'exosquelette larvaire. Dans la discussion suivante, nous distinguerons deux classes de gènes caractérisés par de tels allèles mutants : **gènes agissant sur le zygote** et **gènes à effets maternels** (figure 25-2). Les gènes à action zygotique sont ceux pour lesquels les produits contribuant au développement précoce ne sont exprimés que dans le zygote. Ils sont partie de l'ADN du zygote et sont un groupe de gènes «standards» parmi ceux auxquels nous pensons habituellement. Les mutations récessives dans les gènes agissant sur le zygote ne montrent des phénotypes mutés que chez l'animal muté homozygote. La catégorie alternative -les gènes à effet maternel- affectent le développement précoce en apportant des *produits* de gènes de l'ovaire maternel à l'ovocyte. Comme nous le verrons, les déterminants initiaux des axes A/P et D/V agissent dans le développement de l'ovocyte bien avant la fertilisation. Pour les mutations à effet maternel, le phénotype de la descendance dépend du génotype de la mère et non de celui de la descendance! Une mutation récessive de gène à effet maternel ne produira des animaux mutants que si la mère est un mutant homozygote.

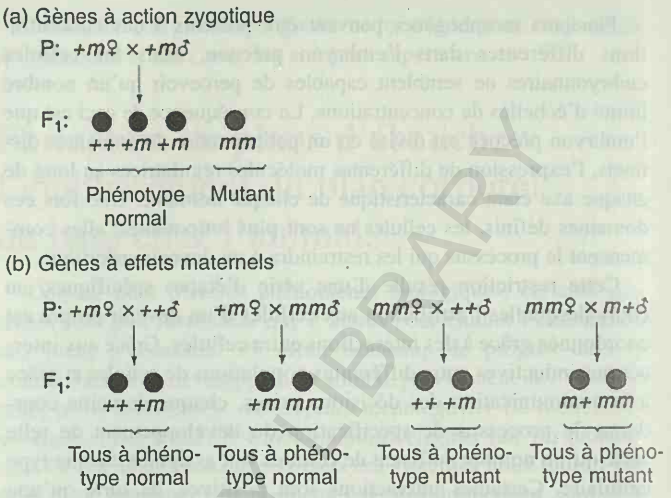


Figure 25-2. La distinction génétique entre des mutations récessives (a) agissant dans le zygote et (b) à effet maternel. (a) Les phénotypes des descendants sont purement le reflet de leur propre génotype. (b) Les phénotypes des descendants sont purement le reflet du génotype de leur mère.

Message L'analyse phénotypique de mutants larvaires peut mener à l'identification des gènes qui contrôlent le plan de base du corps.

Analyse moléculaire des gènes de plans d'ébauche.

Chaque gène de *Drosophila* peut être cloné si sa localisation sur la carte chromosomique a été établie, en utilisant les techniques de l'ADN recombinant telles que décrites aux chapitres 14 et 15. L'analyse des gènes clonés apporte souvent des informations intéressantes sur la fonction de la protéine produite -habituellement en repéranr des séquences homologues à celle du polypeptide codé dans les banques de données publiques. De plus, on peut rechercher les modes d'expression spatial et temporel de (1) un ARNm, en utilisant des séquences d'ADN monocaténaire histochimiquement ciblées et complémentaires de l'ARNm; on réalise ainsi une **hybridation d'ARN *in situ***, ou (2) d'une protéine en employant des anticorps histochimiquement ciblés, se liant spécifiquement à la protéine; on suit ainsi une réaction **immunohistochimique**.

Les techniques de mutagenèse *in vitro* sont aussi largement utilisées. Des éléments P sont utilisés pour la transformation de la lignée germinale chez *Drosophila* (voir chapitre 21). Un gène de plan d'ébauche cloné est muté en tube à essai et réinjecté dans la mouche. On détermine ensuite de quelle manière la mutation altère la fonction du gène.

Message Il suffit de connaître la localisation du gène sur la carte chromosomique pour pouvoir le cloner. Les techniques d'ADN recombinant permettent de purifier physiquement les gènes, leur transcrit et leur produit protéique et ainsi étudier le schéma spatial et temporel de localisation dans l'embryon de l'ARNm ou de la protéine.

Un synopsis du développement précoce chez *Drosophila*

Ayant considéré les outils de base du généticien du développement, nous pouvons revenir à notre discussion du développement précoce de *Drosophila*. Nous envisagerons en premier lieu l'anatomie et l'organisation de l'ovocyte et de l'embryon précoce en développement. Dans le contexte de cette information nous discuterons des événements majeurs conduisant à l'établissement des axes corporels A/P et D/V.

Ovogenèse

Chaque ovocyte occupe un follicule : ce est le résultat d'une coopération entre lignée germinale et cellules somatiques (Figure 25-3).

L'**ovocyte** et 15 **cellules nourricières** proviennent toutes par mitose d'une cellule précurseur de la lignée germinale. Ces 16 cellules partagent un cytoplasme commun, avec des conduits annulaires interconnectant les cellules. Ces connections permettent aux cellules nourricières de fournir l'essentiel du contenu du cytoplasme de l'ovocyte. Le cytoplasme de l'ovocyte apparaît homogène sauf au pôle postérieur où des petites particules ribonucléoprotéiques (ARN plus protéine) sont présentes. Comme nous le verrons, ces granules polaires participent à la formation de l'axe A/P ainsi qu'à la détermination de la lignée germinale.

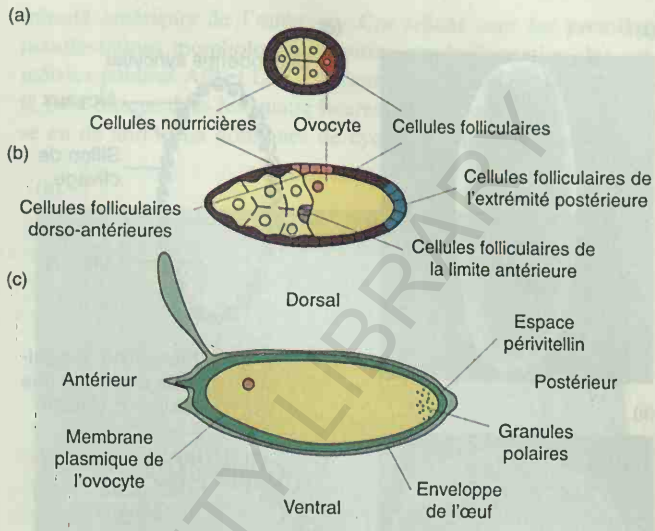


Figure 25-3. Trois étapes de la maturation de l'œuf chez *Drosophila*. (a) Une enceinte folliculaire jeune. Les cellules folliculaires entourent un groupe de 16 cellules dans lesquelles les cellules nourricières et l'ovocyte sont de tailles égales. (b) Une étape intermédiaire. Les cellules nourricières ont commencé à déverser leur contenu dans le cytoplasme de l'ovocyte au travers des canaux annulaires (voir texte). Les cellules folliculaires commencent à former l'enveloppe de l'œuf. (c) Un ovocyte mature. Les cellules nourricières et folliculaires ont disparu, et la membrane plasmique de l'ovocyte se retrouve sous deux couches de l'enveloppe : la membrane vitelline et le chorion. A noter les granules polaires à l'extrémité postérieure de l'ovocyte. (modifié de Chistiane Nüsslein-Volhard, *Development*, Suppl. 1, 1991, 1.)

Les cellules somatiques de chaque follicule sont appelées **cellules folliculaires**. En même temps que les cellules nourricières fournissent le cytoplasme des ovocytes (ovoplasme), les 1000 cellules folliculaires qui entourent chaque complexe ovocyte-cellule nourricières contribuent à la maturation ovocytaire de deux façons.

Figure 25-4. Microphotographie de l'enceinte folliculaire à une étape intermédiaire, colorée de manière à souligner les contours des canaux annulaires. Les canaux annulaires sont les lieux de passage pour le cytoplasme des cellules nourricières vers l'ovocyte. (F. Xu et L. Cooley, Yale University School of Medicine)

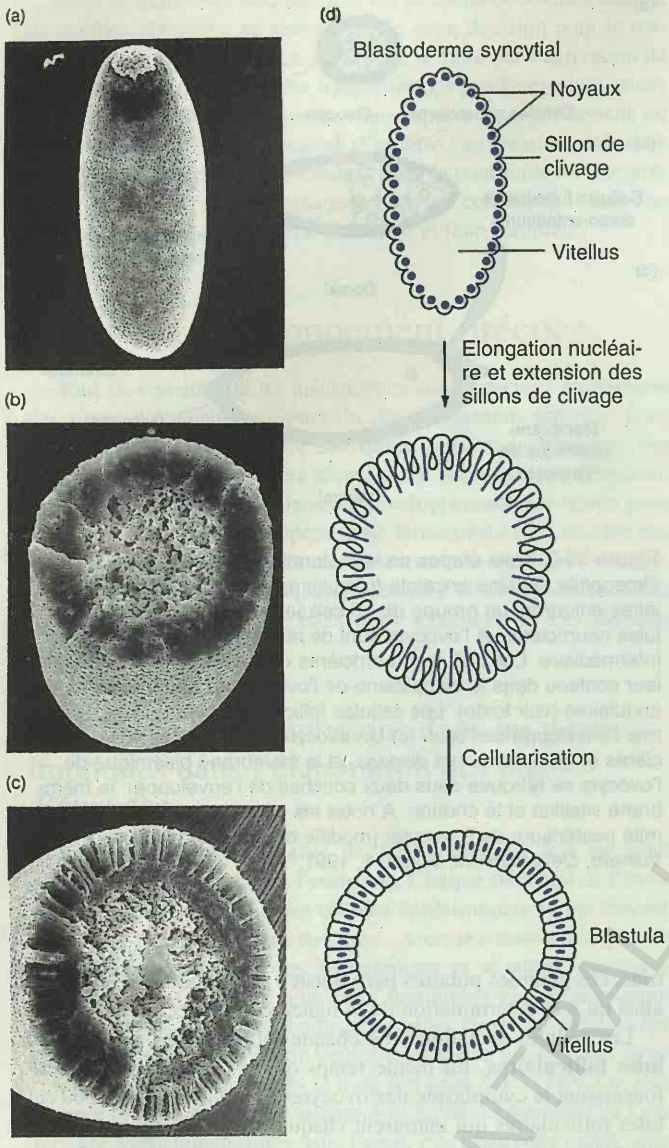


Figure 25-5. Quelques aspects de la multiplication nucléaire et de la formation du blastoderme dans l'embryon de *Drosophila melanogaster*. L'embryon commence comme un syncytium ; la cellularisation est incomplète avant qu'il y ait environ 6000 noyaux. (a) à (c) Micrographies par microscope électronique à balayage d'embryons débarrassés de leur enveloppe. (a) Après la neuvième division nucléaire les cellules polaires (la calotte de cellules au sommet de l'embryon) migrent vers l'extérieur du syncytium somatique. (b) Un embryon syncytial à l'étape du blastoderme, fracturé pour faire apparaître le cytoplasme commun vers la périphérie et le vitellus central. Les bosselures à l'extérieur de l'embryon indiquent le début de la cellularisation, qui progresse de l'extérieur vers l'intérieur. (c) Un blastoderme cellulaire d'embryon, fracturé pour montrer les cellules columnaires qui ont été formées en invaginant les membranes cellulaires entre les noyaux pour former environ 6000 cellules mononucléées. (d) Diagramme schématique des changements qui ont lieu dans les parties a à c, montrant le développement de la forme syncytiale vers la forme cellularisée. (F. R. Turner et A. P. Mahowald, *Developmental Biology*, 50, 1976, 95.)

Tout d'abord, ce sont les cellules folliculaires qui sont responsables de la formation de l'enveloppe de l'oeuf, ou chorion, qui entoure l'ovocyte. Ensuite, comme nous le verrons dans les sections suivantes, la communication intercellulaire entre cellules folliculaires et ovocyte aide à établir les axes de l'ovocyte et de l'embryon. Il y a plusieurs sous-populations importantes de cellules folliculaires : cellules de lisière, dorso-antérieures et du corps central (Figure 25-3).

Le zygote et les premières étapes.

Toute l'embryogenèse ne dure qu'un jour. Dans cette section, nous considérerons les 3 premières heures, le stade de multiplication rapide. L'embryon précoce de *Drosophila* est un syncytium multinucléé : les noyaux se divisent mais pas l'oeuf lui-même. Neuf divisions nucléaires ont lieu, se succédant rapidement, les noyaux restant au centre de l'oeuf. Ensuite les noyaux migrent vers la périphérie (cortex) de l'oeuf (Figure 25-5). Les

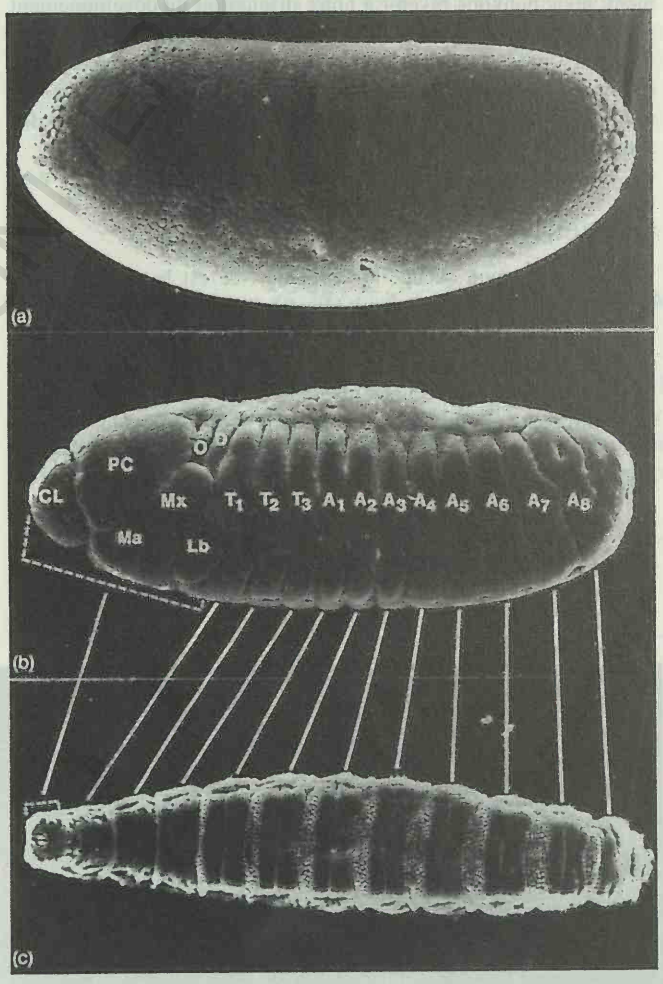


Figure 25-6. Micrographie par microscope électronique à balayage de (a) un embryon de *Drosophila* de 3 heures, (b) un embryon de 10 heures et (c) une larve nouvellement éclose. Noter qu'après 10 heures la segmentation de l'embryon est manifeste. Les lignes sont tracées pour indiquer que l'identité segmentaire des cellules le long de l'axe A/P est déterminée très tôt dans le développement. (T. C. Kaufman et F. R. Turner, Indiana University)

premiers noyaux atteignent le cortex postérieur et sont cellularisés (transformé en cellules) en étant capturés dans des invaginations de la membrane du plasma. Le cytoplasme de ces cellules contient les granules polaires, et ces « cellules polaires » arrondies forment finalement la totalité de la lignée germinale de la mouche. Les noyaux restant subissent encore quatre divisions et forment une mono-couche de noyaux dans le cortex de l'oeuf : c'est l'état **blastoderme syncytial**. La membrane plasmique de l'oeuf s'invagine ensuite autour de chaque noyau et, dans un premier temps, chaque noyau est contenu dans une cellule différente c'est le stade **blastoderme cellulaire** (Figure 25-6a).

Avant le stade de blastoderme cellulaire, des molécules solubles peuvent diffuser au travers du cytoplasme commun de l'oeuf. Dès qu'intervient la cellularisation, les membranes plasmiques isolent les contenus de chaque cellule et les interactions entre cellules dépendent des mécanismes standard de la communication intercellulaire.

Du blastoderme à la larve.

La gastrulation suit rapidement l'état de blastoderme cellulaire, avec ses mouvements caractéristiques impliquant des couches de tissus. Deux sillons sont formés : un sillon ventral est formé au milieu, le long de l'embryon en gastrulation (Figure 25-7) et un sillon céphalique oblique est formé à environ un sixième de l'extrémité antérieure de l'embryon. Ces sillons sont les premières manifestations morphologiques autres que la formation des asymétries polaires A/P et D/V. Une autre manifestation de la polarité D/V est que dans les quatre heures, l'embryon se retrouve divisé en de nombreux domaines de cycles cellulaires (Figure 25-8).

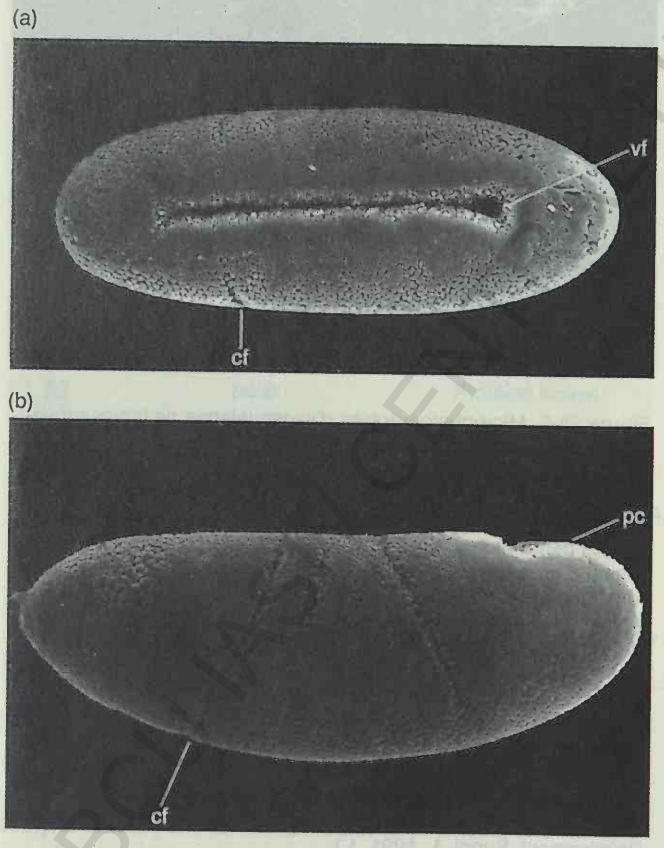


Figure 25-7. Invagination dans l'embryon précoce de *Drosophila*. (a) Vue ventrale. (b) Vue latérale. vf = sillon ventral ; cf = sillon céphalique ; pc = cellules polaires (micrographie par microscope électronique à balayage aimablement fournie par T. C. Kaufman et F. R. Turner, Indiana University)

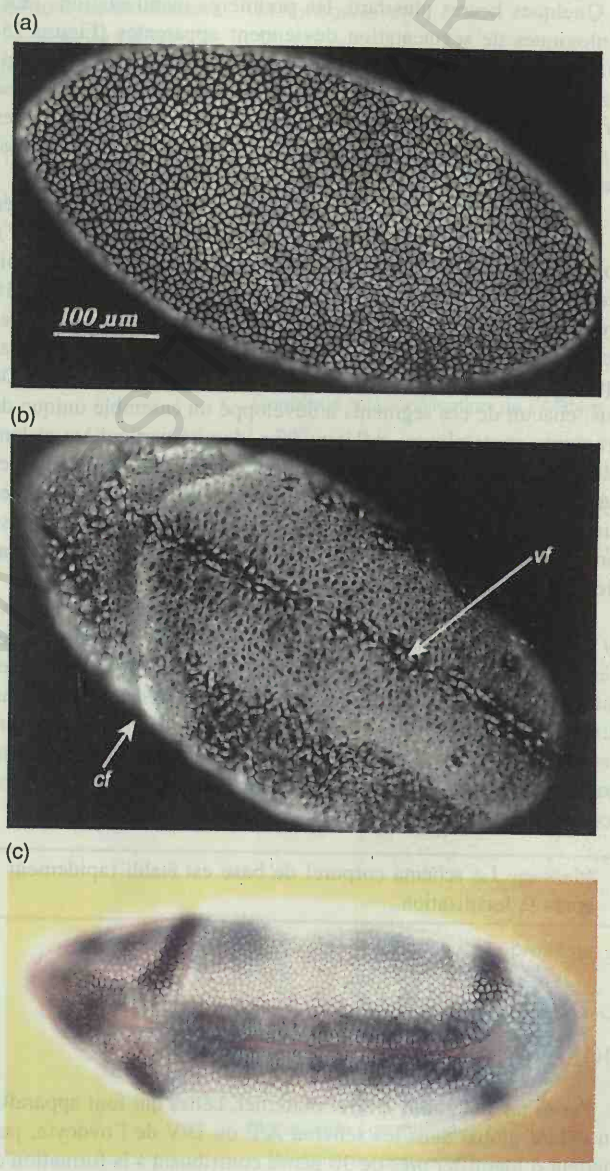


Figure 25-8. Régulation du cycle cellulaire dans l'embryon précoce de *Drosophila*. (a) Avant que l'étape de blastoderme cellulaire ne soit révolue, toutes les divisions cellulaires sont synchrones. (b) et (c) Pendant la gastrulation, la progression dans le cycle cellulaire varie d'un domaine à l'autre de l'embryon. Dans la photo b, par exemple, les cellules invaginées du sillon ventral et les cellules du mésectoderme, qui forment les lèvres du sillon ventral (vf ; voir figure 25-7) sont en mitose. Dans la partie c, l'ARNm de *string*, un gène de *Drosophila* qui active la protéine kinase cycline dépendante et par là induit la progression du cycle cellulaire, est exprimé dans les cellules, y compris le sillon ventral qui entre alors en mitose, comme en (b). Les parties a et b montrent la coloration des microtubules et mettent bien en évidence les fuseaux mitotiques. La partie c montre la distribution d'ARNm par hybridation *in situ* (a et b de V. E. Foe, *Development* 107, 1989, 1-22. La partie c est de B. A. Edgar, D. A. Lehman et P. H. O'Farrell, *Development* 120, 1994, 3133.)

Les ensembles cellulaires d'un même domaine progressent en synchronie dans le cycle. Les cellules de différents domaines ne sont donc pas en phase l'une par rapport à l'autre. Beaucoup de ces domaines correspondent à des populations cellulaires différentes tout au long de l'axe D/V.

Quelques heures plus tard, les premières manifestations morphologiques de segmentation deviennent apparentes (Figure 25-6b). Douze heures après la fertilisation, l'organogenèse se manifeste; après 15 heures, l'exosquelette de la larve commence à se former avec ses appendices spécialisés et d'autres structures externes. Près de 24 heures après la fertilisation, une larve totalement formée sort de l'enveloppe de l'oeuf (Figure 25-6c).

La larve de *Drosophila* est clairement et fortement différenciée le long de ses axes tête-queue (A/P) et dessus-dessous (D/V). Comme chez d'autres animaux, la première question est de savoir comment ces deux développement axiaux sont établis. Après 10 heures de développement, l'embryon est déjà divisé extérieurement en 14 segments : suivant la polarité A/P - 3 segments céphaliques, 3 thoraciques et 8 segments abdominaux (Figure 25-6c). De plus, chacun de ces segments a développé un ensemble unique de structures anatomiques, reflétant leur identité particulière et leur rôle dans la biologie de l'animal. Pour comprendre le développement de l'axe corporel A/P, il faut garder en mémoire quelques questions. Comment est établi ce profil segmentaire ? Comment se forme toujours le nombre exact de segments ? Comment son identité est-elle assignée à chaque segment ?

De même, l'axe D/V est très différencié. Le long de cet axe D/V, les déterminations de divers types cellulaires sont détectables très précocement. Le sillon ventral et la distribution cellulaire des domaines sont deux manifestations différentes des devenirs cellulaires selon l'axe D/V dès 4 heures après la fertilisation. Comment l'embryon spécifie-t-il le devenir des cellules D/V ? Nous verrons dans les sections suivantes que la réponse implique une collaboration entre la mère et la descendance.

Message Le schéma corporel de base est établi rapidement après la fertilisation.

L'établissement de l'information positionnelle

Parmi les mutations à effet maternel, celles qui font apparaître un défaut global dans les schéma A/P ou D/V de l'ovocyte, permettent d'identifier près de 30 gènes contribuant à la formation de l'axe corporel. Grâce à l'analyse moléculaire de ces gènes et de leurs allèles mutés et à l'étude de leur expression nous avons maintenant une bonne vue d'ensemble de la manière dont ils contribuent à l'établissement des coordonnées chimiques définissant les deux axes corporels majeurs. Parmi ces 30 gènes, plusieurs classes peuvent être distinguées sur base des phénotypes mutants et d'après la manière dont ils contribuent au développement (Figure 25-9 et Tableau 25-1).

Beaucoup de gènes auxquels nous nous intéressons, altèrent le devenir de l'ovocyte et de l'embryon qui en résulte, mais ne modifient pas la disposition des cellules folliculaires somatiques ni celle de l'enveloppe qu'elles produisent. Les phénotypes mutants

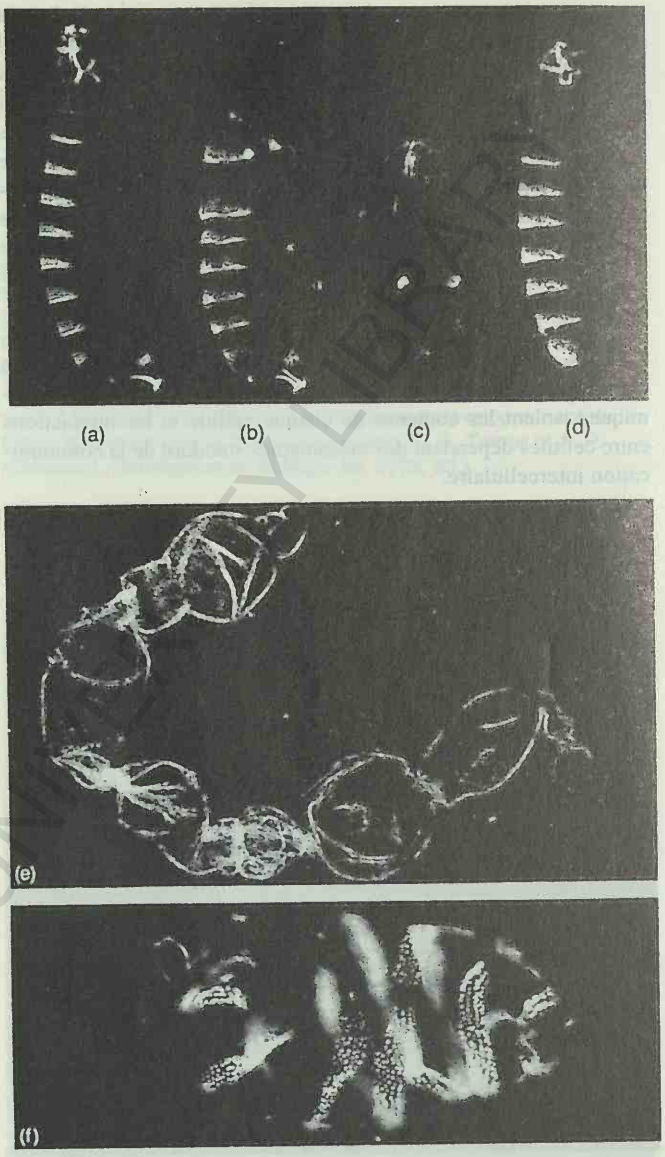


Figure 25-9. Microphotographies d'exosquelettes de larves provenant de mères de type sauvage et de mères portant une mutation létale à effet maternel. Ces microphotographies sont réalisées en fond noir, de sorte que les structures denses apparaissent blanches, comme dans un négatif photographique. Noter les bandes denticulaires répétées de manière segmentaire sur le côté ventral de l'embryon. Les génotypes maternels et phénotypes larvaires (et la classe de mutation correspondante) sont les suivants : (a) type sauvage, phénotype normal ; (b) *bcd* (*bicoïde*), les structures antérieures céphaliques et thoraciques antérieures manquent ; (c) *osk* (*oskar*), les segments postérieurs (abdominaux) sont manquants ; (d) *tsl* (*torso-like*), dépourvu des deux régions terminales non segmentées ; (e) *dl* (*dorsal*) dépourvus des bandes denticulaires ventrales ; et (f) *cact* (*cactus*) dépourvu d'épiderme dorsal et à bandes denticulaires ventrales enveloppant l'embryon. (Parties a-d de C. H. Nüsslein-Volhard, G. Frohnhöfer et R. Lehmann, Science 238, 1987, 1678. c et f de Christiane Nüsslein-Volhard, *Development*, Suppl. 1, 1991, 1.)

Tableau 25-1. Exemples de gènes à effet maternel de *Drosophila*, contribuant à l'information de positionnement.

Symbole des gènes	Nom des gènes	Fonction de la protéine	Contribution à l'information de positionnement
Gènes de l'information de positionnement A/P :			
bcd	*bicoid*	Facteur de transcription - protéine à homéodomaine	Morphogène A/P
hb-m	*hunchback-maternal*	Facteur de transcription - protéine à doigt à zinc	Morphogène A/P
nos	*nanos*	Protéine se liant à l'ARN (supposée)	Répresseur de traduction de HB-M
pum	*pumilio*	Protéine se liant à l'ARN	Contribue à la répression de HB-M par NOS
vas	*vasa*	Hélicase (protéine déroulant l'ARN ou l'ADN)	Contribue à la localisation de NOS
osk	*oskar*	Inconnue	La protéine et l'ARNm du gène *osk* doivent être localisés au pôle postérieur pour y permettre la localisation de l'ARNm *nos* et de la protéine NOS
exu	*exuperentia*	Protéine se liant à l'ARN	Contribue à la localisation de l'ARNm *bcd*
swa	*swallow*	Protéine se liant à l'ARN	Contribue à la localisation de l'ARNm *bcd*
Gènes de l'information de positionnement D/V :			
dl	*dorsal*	Facteur de transcrition DL	Morphogène D/V
cact	*cactus*	Se fixe à la protéine DL dans le cytoplasme	Régule l'activation régionale du morphogène D/V
spz	*spätzle*	Signalant le ligand SPZ	Régule l'activation régionale du morphogène D/V
Tl	*Toll*	récepteur du ligand SPZ	Régule l'activation régionale du morphogène D/V
snk	*snake*	Sérine protéase	Active la protéine SPZ par une cascade protéolytique de clivages enzymatiques
ea	*easter*		
gd	*gastrulation-defective*		
tube	*tube*	Inconnue	Exigé pour l'activation de la protéine DL
pll	*pelle*	Protéine kinase	Exigé pour l'activation de la protéine DL
Gènes de l'information de positionnement A/P et D/V:			
grk	*gurken*	Signalant le ligand GRK	Signaux de l'ovocyte aux cellules folliculaires pour établir les devenirs postérieur et antéro-dorsal
Egfr	*récepteur EGF*	Récepteur de tyrosine kinase	Reçoit le signal de la protéine GRK dans les cellules folliculaires

comprennent la perte de tous les segments antérieurs (par exemple *bicoid*), postérieurs (p.ex. *nanos*), de tout le matériel ventral (p.ex. *dorsal*) ou de tous les tissus dorsaux (p.ex. *cactus*). Ces gènes codent soit pour les morphogènes définissant les deux axes ou pour des produits contribuant à la localisation et à la distribution asymétrique des morphogènes. Nous envisagerons, en premier lieu, les contributions maternelles aux deux axes.

Les morphogènes A/P.

Il y a, le long de l'axe A/P, deux morphogènes, BCD et HB-M agissant de concert pour fournir l'information de position A/P. La protéine BCD, codée par le gène *bicoïd* (*bcd*) est répartie en un gradient abrupt chez l'embryon précoce, alors que la protéine HB-M, codée par le gène *hunchback (hb)* est distribuée selon un gra-

ACU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

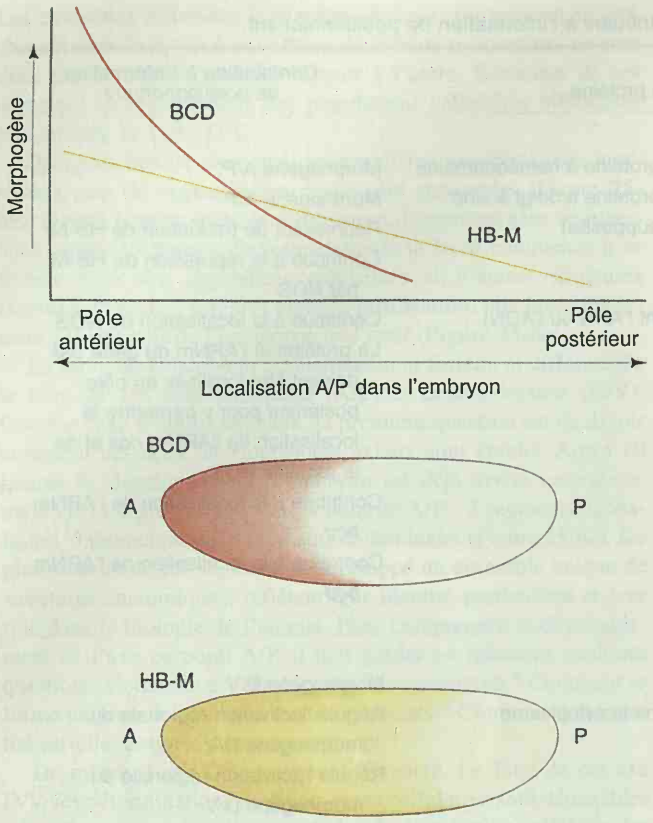


Figure 25-10. Les gradients des protéines BCD et HB-M. Le gradient de BCD est plus raide et la protéine BCD n'est pas détectable dans la moitié postérieure de l'embryon précoce de *Drosophila*. Le gradient de HB-M est plus atténué et cette protéine peut aussi être détectée dans la moitié postérieure de l'embryon.

dient faible (Figure 25-10). Comme nous le verrons, ces deux protéines sont des facteurs de transcription, et, ensemble, contribuent à l'activation ou à la répression de gènes exprimés dans l'embryon précoce.

Le gradient BCD.

Comment savons-nous que ces molécules sont les morphogènes A/P ? Considérons en détail l'exemple de BCD. Tout d'abord, les changements génétiques du gène *bcd* affectent le devenir antérieur. Des embryons provenant de mutants maternels *bcd*, homozygotes d'allèles nuls, sont dépourvus de segments antérieurs (Figure 25-9b). Si, par contre, il y a surexpression de *bcd* chez la mère, par accroissement du nombre de copies du gène *bcd*, de 2 à 3 ou 4 fois, sinon plus, on décale progressivement vers les zones postérieures de l'embryon ce qui est normalement antérieur (Figure 25-11). Ces observations suggèrent que *bcd* exerce un contrôle global de l'information de positionnement du type antérieur.

Ensuite, l'ARNm *bcd* peut remplacer complètement l'activité du déterminant antérieur présent dans la partie antérieure de l'ovoplasme (Figure 25-12). Si on enlève le cytoplasme antérieur d'un oeuf, les segments antérieurs (tête et thorax) sont perdus. L'injection d'ovoplasme antérieur provenant d'un autre oeuf corrige cette déficience : il y a rétablissement du segment antérieur, et une larve normale est formée. De même, un ARNm synthétique peut être réalisé en tube à essai et injecté dans la région antérieure d'un oeuf dépourvu d'ovoplasme antérieur. Dans ce cas également, une larve normale est produite.

Troisièmement, l'ARNm *bcd* est localisé au pôle antérieur de l'ovocyte, comme prédit par les expériences de transplantation d'ovoplasme. La transplantation de cytoplasme des régions médiane ou postérieure d'un ovocyte ne rétablira pas une région antérieure normale. Ceci prédit que le déterminant antérieur est localisé à l'extrémité antérieure de l'oeuf. La localisation *in situ* de l'ARNm *bcd* révèle, en effet, une localisation stricte au pôle antérieur de l'ovocyte (Figure 25-13a).

Enfin, quatrièmement, la distribution de la protéine BCD est asymétrique et présente un gradient le long de l'axe A/P. L'immunohistochimie, utilisant des anticorps anti-BCD (anticorps se

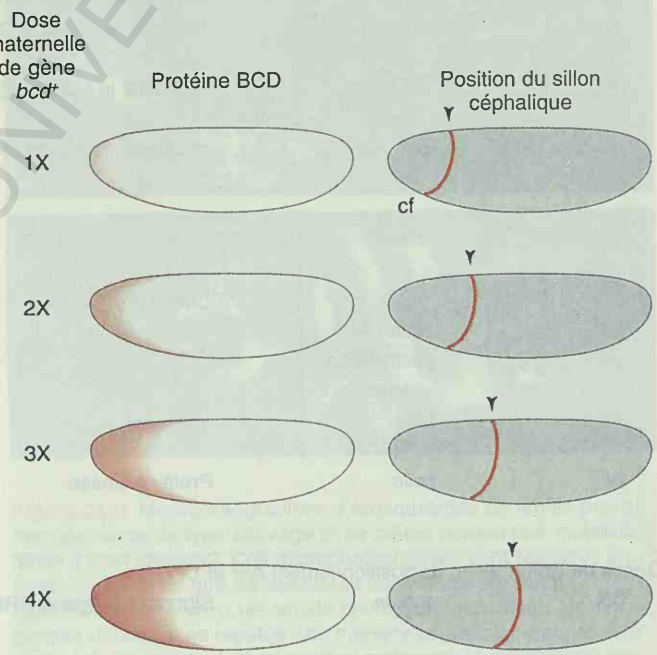


Figure 25-11. La concentration de la protéine BCD affecte le devenir des cellules le long de l'axe A/P. La quantité de la protéine BCD peut être modifiée en faisant varier le nombre de copies du gène *bcd*$^+$ dans la mère. Les embryons provenant de mères ayant de une à quatre copies de *bcd*$^+$ ont des concentrations croissantes de la protéine BCD. (Deux copies est la dose normale de gène dans les cellules diploïdes.) Les cellules qui sont invaginées pour former le sillon céphalique (voir figure 25-7) le font en réponse à une concentration spécifique de la protéine BCD. Lorsque les embryons possèdent de une à quatre copies maternelles de *bcd*$^+$, cette concentration spécifique est présente de plus en plus postérieurement dans l'embryon. Ainsi, la position du sillon céphalique (marquée dorsalement par le triangle) apparaît de plus en plus postérieure en fonction de la dose de gène *bcd*$^+$. (Adapté de W. Driever et C. Nüsslein-Volhard, *Cell*, 54, 1988, 100-101.)

MARSY / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

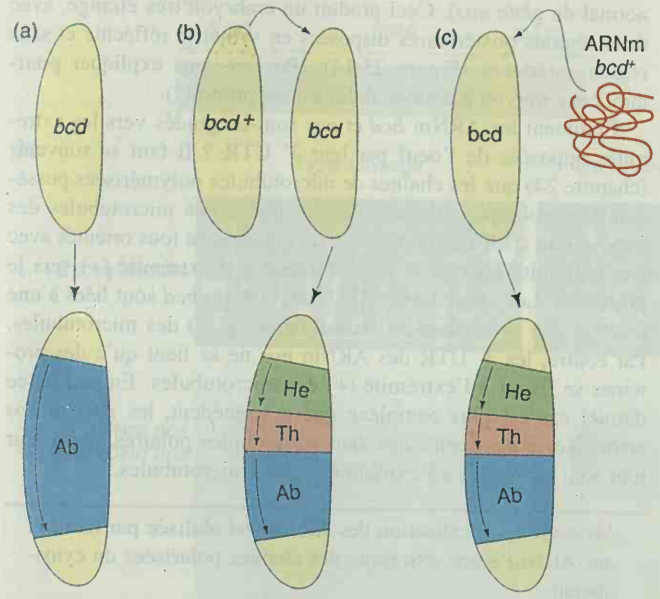
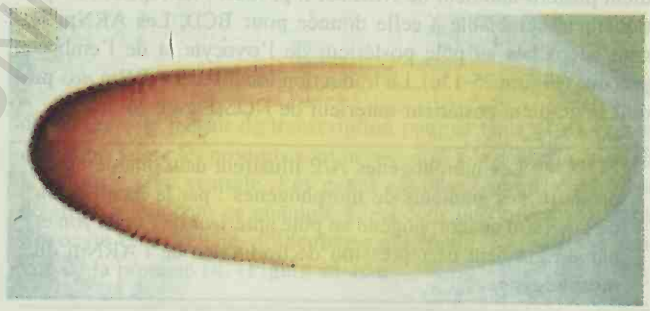


Figure 25-12. Le phénotype mutant *bcd* «anterior-less» (dépourvu d'antérieur) peut être réparé par le cytoplasme du type sauvage ou par l'ARNm *bcd*+ purifié. (a) Dans les embryons provenant de mères *bcd*, les segments antérieurs (tête et thorax) ne sont pas formés. (b) Si le cytoplasme d'un embryon précoce donneur de type sauvage est injecté dans la partie antérieure d'un embryon récepteur d'une mère mutante *bcd*, un embryon et une larve parfaitement normaux sont produits. Le cytoplasme d'une autre partie d'un embryon donneur ne produit pas cet effet. (c) L'ARNm *bcd*+ injecté dans la partie antérieure d'un embryon provenant d'une mère mutante *bcd* répare également le schéma de segmentation. Une larve *bicoid* est présentée dans la figure 25-9b. (Adapté de C. Nüsslein-Volhard, H. G. Fronhöfer et R. Lehmann, *Science* 238, 1987, 1679.)

(a)


(b)

(c)

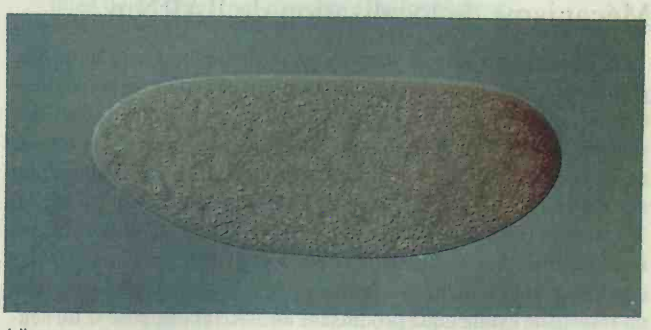

(d)

Figure 25-13. Microphotographie montrant l'expression localisée de déterminants A/P dans l'embryon. (a) Par hybridation *in situ* à l'ARN, on peut observer la localisation de l'ARNm *bcd* dans la partie antérieure de l'embryon (à gauche). (b) Par coloration aux anticorps, un gradient de protéine BCD (coloration brune) peut être visualisé, avec une plus forte concentration à l'extrémité antérieure. (c) L'ARNm *nos* est localisé à l'extrémité postérieure (droite) de l'embryon, et (d) la protéine NOS montre un gradient avec une concentration maximale à l'extrémité postérieure. (a et b de Christiane Nüsslein-Volhard, *Development*, Suppl. 1, 1991, 1. c et d fournis par Elizabeth R. Gavis, Laura K. Dickinson et Ruth Lehmann, Massachusetts Institute of Technology.)

LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

liant à la protéine BCD) montre que la protéine BCD est distribuée selon un gradient avec une forte concentration au pôle antérieur et atteignant un minimun vers le milieu de l'embryon (Figure 25-13b).

Le gradient HB-M.

La protéine HB-M est distribuée suivant un gradient moins accentué et s'étend plus postérieurement que celui de BCD (Figure 25-10). Ceci conforte l'idée de contributions importantes de la protéine HB-M pour le sort des régions médiane et postérieure de l'embryon.

Le gradient de la protéine HB-M est produit par régulation post-transcriptionelle. L'ARNm *hb-m* est réparti uniformément dans l'ovocyte et dans l'embryon précoce. Cependant, la traduction de l'ARNm *hb-m* est bloquée par une protéine qui réprime la traduction {la protéine NOS produite par le gène *nanos (nos)*}, qui est elle-même répartie en un gradient inverse de celui de *bcd*, avec une forte concentration au pôle postérieur et une chute qui atteint le niveau de base vers le milieu de l'axe A/P. La protéine NOS a la possibilité de bloquer spécifiquement la traduction de l'ARNm *hb-m*. Ainsi, indirectement le gradient postérieur à antérieur du répresseur de traduction NOS produit un gradient en pente douce pour la protéine HB-M. Le mutant phénotypique *nos* est en accord avec cette idée. Les mères homozygotes *nos* zéro produisent des embryons dépourvus de segments postérieurs. Comment le gradient postéro-antérieur de NOS est-il produit ? La réponse est pratiquement semblable à celle donnée pour BCD. Les ARNm *nos* sont accrochés au pôle postérieur de l'ovocyte et de l'embryon précoce (Figure 25-13c). La traduction localisée d'ARNm *nos* produit le gradient postérieur-antérieur de NOS(Figure 25-13d).

Message Les morphogènes A/P illustrent deux manières de produire des gradients de morphogènes : par la localisation de l'ARNm de morphogène au pôle antérieur de l'embryon et par un gradient de répression de traduction de l'ARNm du morphogène.

Mécanisme de localisation de l'ARNm

D'une manière directe dans un cas et indirecte dans l'autre, les gradients antéro-postérieur de BCD et HB résultent de la localisation des ARNm dans l'ovocyte. Comment les ARNm *bcd* et *nos* sont-ils localisés respectivement aux pôles antérieur et postérieur de l'ovocyte ? Dans les deux cas, il semble qu'il y ait interaction des régions 3' non traduites (3' UTR) de chaque ARNm (la région 3' par rapport au codon de terminaison de traduction) avec les microtubules du cytosquelette. Ceci a été établi en partie par des expériences « d'échange ». Insérons dans le génome de la mouche un transgène synthétique produisant un ARNm composé d'un segment 5' UTR et des régions codantes de la protéine d'ARNm de *nos* associé au segment 3' UTR de l'ARNm *bcd* ; cet ARNm *nos-bcd* fusionné sera localisé au pôle antérieur de l'ovocyte. Ceci provoque un double gradient de NOS : l'un antéro-postérieur (dû à l'ARNm transgénique) et l'autre postéro-antérieur (dû à l'ARNm normal du gène *nos*). Ceci produit un embryon très étrange, avec deux régions postérieures disposées en symétrie réfléchie et sans région antérieure (Figure 25-14). (Pouvez-vous expliquer pourquoi cet embryon à double abdomen est produit?).

Comment les ARNm *bcd* et *nos* sont-ils guidés vers les extrémités opposées de l'oeuf par leur 3' UTR ? Il faut se souvenir (chapitre 24) que les chaînes de microtubules polymérisées possèdent une polarité - (moins) vers + (plus). Les microtubules des ovocytes au stade tardif et à celui du zygote sont tous orientés avec leur extrémité (-) vers le pôle antérieur et l'extrémité (+) vers le postérieur. Les séquences 3' UTR des ARNm *bcd* sont liées à une protéine qui peut aussi se lier à l'extrémité (-) des microtubules. Par contre, les 3' UTR des ARNm *nos* ne se lient qu'à des protéines se fixant à l'extrémité (+) des microtubules. En réalité, ce dernier cas est plus complexe que le précédent, les ARNm *nos* étant fixés à des molécules dans les granules polaires, qui à leur tour sont accrochés à l'extrémité (+) des microtubules.

Message La localisation des ARNm est réalisée par fixation des ARNm à une extrémité des chaînes polarisées du cytosquelette.

Le morphogène D/V

Le mode de formation du gradient de morphogène D/V est très différent de celui qui répartit les morphogènes A/P et dépend d'une série d'interactions intercellulaires entre sous-populations de cellules folliculaires et l'ovocyte lui-même. Le gène *dorsal* (*dl*) code pour l'unique morphogène D/V, la protéine DL, un facteur de transcription qui contrôle le devenir cellulaire. L'ARNm *dl* est réparti uniformément dans l'ovocyte, comme l'est la protéine DL. Cependant dans l'embryon précoce, il y a un gradient de protéine DL *active*, le long de la ligne médio-ventrale de l'embryon (Figure 25-15). En absence de toute activité DL, comme dans le cas des embryons produits à partir de mères homozygotes *dl* zéro, les embryons manquent totalement de structures ventrales. Ainsi, le sillon ventral apparaissant à 4 heures de l'embryogenèse dans le type sauvage n'apparaît jamais chez les embryons de mères mutées *dl*.

Comment le gradient de protéines DL actives est-il produit ? La protéine DL inactive est située dans le cytoplasme de la cellule, fixée à la protéine CACT codée par le gène *cactus (cact)*. Sur le côté ventral de la chambre de l'oeuf, d'autres gènes à effet maternel D/V sont exprimés. Leurs produits protéiques sécrétés, dont certains proviennent des cellules folliculaires, d'autre de l'ovocyte, activent le ligand SPZ (codé par le gène *spaetzle*) sur la face ventrale uniquement. SPZ se lie au récepteur transmembranaire TOLL (codé par le gène *toll*) qui est ubiquiste dans la membrane plasmique de l'ovocyte. Le complexe SPZ-TOLL déclenche le signal d'un chemin de transduction qui aboutit à la phosphorylation de la protéine DL inductive. La phosphorylation de la protéine DL provoque un changement de conformation qui la libère de la protéine CACT qui séquestrait DL dans le cytoplasme (Figure 25-16). La protéine DL libre peut maintenant migrer vers le noyau

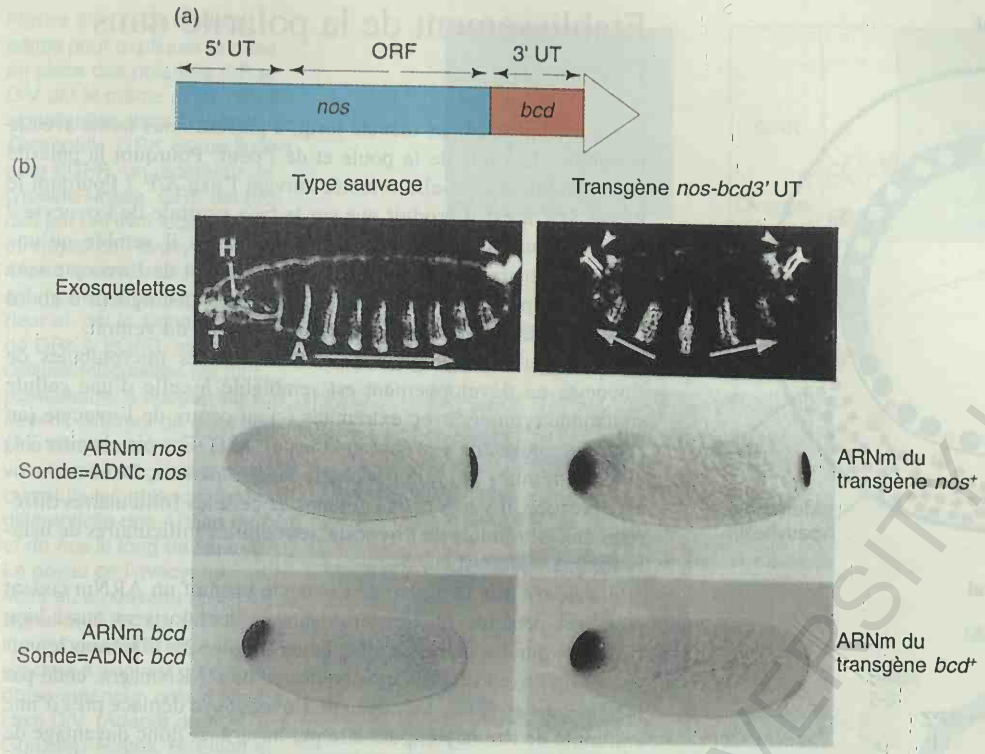
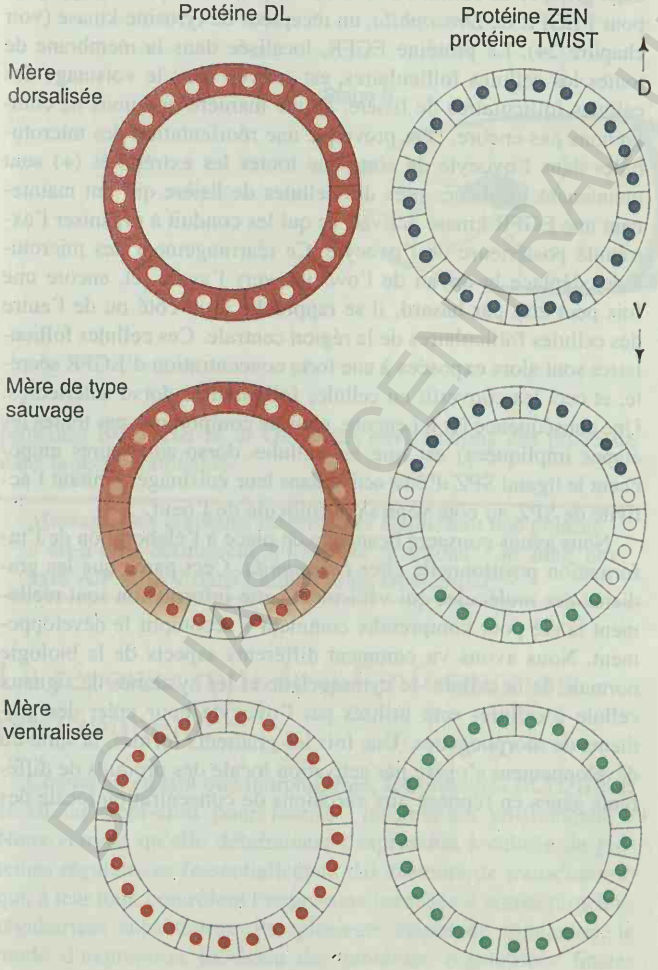


Figure 25-14. Effet du remplacement du 3'UT de l'ARNm *nanos* par le 3'UT de l'ARNm *bicoïd* sur la localisation de l'ARNm et le phénotype embryonnaire. (a) La structure du transgène *nos-bcd3'UT*. (b) Les effets du transgène sur le développement embryonnaire. Les embryons et larves de la colonne de gauche sont produits par des mères sauvages. Ceux de la colonne de droite proviennent de mères transgéniques. Tous les embryons sont présentés avec le pôle antérieur vers la gauche et le pôle postérieur vers la droite. Les exosquelettes sont montrés pour comparaison. Le transgène provoque une double image en miroir de l'abdomen. Dans l'embryon d'une mère transgénique, les ARNm codant pour la protéine NOS sont alors présents aux deux pôles de l'embryon. La protéine NOS inhibe la traduction de l'ARNm *hb-m* (et aussi de l'ARNm *bcd*). (De E. R. Gavis et R. Lehmann, *Cell* 71, 1992, 303.)



où elle sert de facteur de transcription pour certains gènes (gènes cardinaux) dont les produits sont nécessaires à la détermination de la future région ventrale. Les gènes cardinaux seront étudiés en détail plus loin dans ce chapitre. C'est donc une interaction entre l'ovocyte et les cellules folliculaires qui établit le gradient d'activité de la protéine DL (Figure 25-15).

Message Le morphogène D/V illustre une troisième manière de produire un gradient de morphogène : par l'activation graduée de morphogènes distribués uniformément

Figure 25-15. Distribution du morphogène DL et des protéines ZEN et TWIST des gènes D/V *zen* et *twist* dans une section transversale d'embryon de *Drosophila* au stade blastoderme. La protéine DL présente normalement un gradient allant du noyau au cytoplasme tout au long de la circonférence de l'embryon, avec la plus forte concentration nucléaire dans la région ventrale. La protéine ZEN est normalement localisée dans les noyaux dorsaux de l'embryon et TWIST dans les noyaux ventraux. Les deux gènes codent pour des facteurs de transcription et sont régulés directement par le gradient de morphogène DL. A noter la manière dont les distributions de DL, ZEN et TWIST sont affectées dans les embryons dorsalisés et ventralisés. (Adapté de S. Roth, D. Stein et C. Nüsslein-Volhard, *Cell* 59, 1989, 1196.)

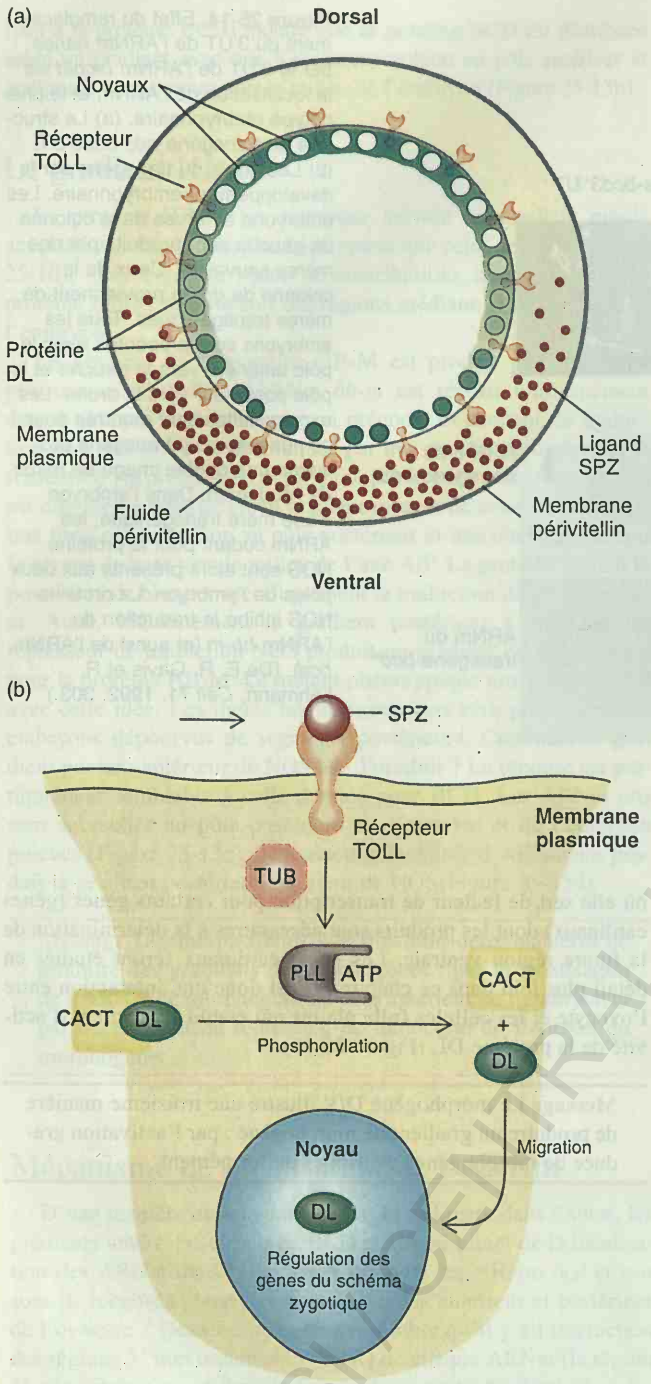


Figure 25-16. Voie qui mène à l'établissement du gradient de la protéine DL du noyau vers le cytoplasme. (a) Une section transversale de l'embryon de *Drosophila* montrant les cellules du blastoderme à l'intérieur de la membrane plasmique et de l'espace (espace périvitellin) entre la limite interne de la membrane de l'embryon (membrane périvitelline) et la membrane plasmique, où le ligand SPZ est produit du côté ventral de l'embryon. Le ligand SPZ se lie au récepteur TOLL, activant un signal de transduction en cascade via de deux protéines appelées TUB et PLL, qui conduit à la phosphorylation de DL et sa libération de CACT. DL peut alors migrer dans le noyau où il est un facteur de transcription pour les gènes cardinaux D/V. (Adapté de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L.Zipursky, P. Matsudiara et J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Scientific American Books, 1995.)

Etablissement de la polarité dans l'ovocyte

Ce dont nous avons discuté jusqu'à présent nous laisse avec le problème classique de la poule et de l'oeuf. Pourquoi la polarité des microtubules est-elle orientée suivant l'axe A/P ? Pourquoi le ligand SPZ n'est-il produit que sur la face ventrale de l'ovocyte ? Nous n'avons qu'une réponse partielle, mais il semble qu'une série de signaux intercellulaires précoces allant de l'ovocyte vers des sous-populations de cellules folliculaires distinguent d'abord le postérieur de l'antérieur, et ensuite le dorsal du ventral.

Au début de l'ovogenèse, la structure des microtubules de l'ovocyte en développement est semblable à celle d'une cellule somatique typique, avec extrémités (-) au centre de l'ovocyte (au centre organisateur des microtubules ou MTOC; voir chapitre 24) et les extrémités (+) à la périphérie du cytoplasme. Dans cet ovocyte précoce, il y a déjà des groupes de cellules folliculaires différents aux extrémités de l'ovocyte, les cellules folliculaires de lisière sont alors au milieu.

La clé est que le noyau de l'ovocyte produit un ARNm codant pour une protéine qui postériorisera et dorsalorisera aussi bien l'ovocyte que les cellules folliculaires (Figure 25-17). Dans le voisinage du noyau de l'ovocyte se trouve de l'ARNm *grk*, codé par le gène *gurken (grk)*. Le noyau de l'ovocyte se déplace près d'une extrémité de l'ovocyte, peut-être par hasard, et donc davantage de protéines GRK seront produites et sécrétées au voisinage d'un des deux groupes de cellules de lisière. La protéine GRK est un ligand pour l'EGFR de *Drosophila*, un récepteur de tyrosine kinase (voir chapitre 24). La protéine EGFR, localisée dans la membrane de toutes les cellules folliculaires, est activée dans le voisinage des cellules folliculaires de lisière. D'une manière que nous ne comprenons pas encore, ceci provoque une réorientation des microtubules dans l'ovocyte de sorte que toutes les extrémités (+) sont maintenant localisées près des cellules de lisière qui ont maintenant une EGFR kinase activée, ce qui les conduit à organiser l'extrémité postérieure de l'ovocyte. Ce réarrangement des microtubules déplace le noyau de l'ovocyte vers l'avant, et, encore une fois peut-être par hasard, il se rapproche d'un côté ou de l'autre des cellules folliculaires de la région centrale. Ces cellules folliculaires sont alors exposées à une forte concentration d'EGFR sécrété, et ceci les convertit en cellules folliculaires dorso-antérieures. Une conséquence (et ici encore, nous ne comprenons pas toutes les étapes impliquées) est que les cellules dorso-antérieures empêchent le ligand SPZ d'être activé dans leur voisinage, limitant l'activité de SPZ au côté ventral du follicule de l'oeuf.

Nous avons consacré beaucoup de place à l'élaboration de l'information positionnelle chez *Drosophila*. Ceci parce que les gradients des molécules qui véhiculent cette information sont réellement la clé pour comprendre comment s'accomplit le développement. Nous avons vu comment différents aspects de la biologie normale de la cellule -le cytosquelette et les systèmes de signaux cellule à cellule- sont utilisés par l'ovocyte pour créer des gradients de morphogènes. Une fois les gradients formés, la suite du développement s'opère par activation locale des produits de différents gènes en réponse aux variations de concentration locale des

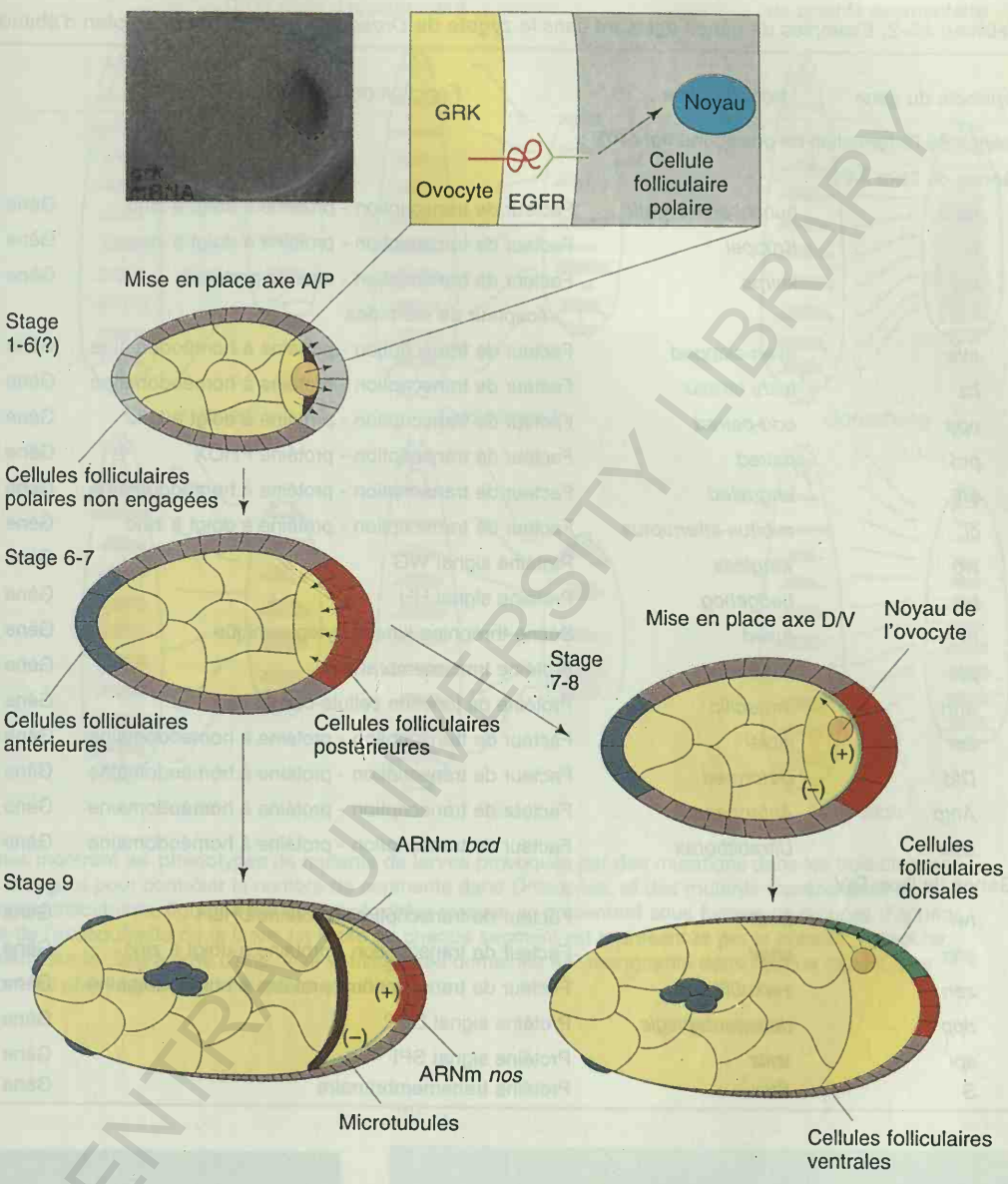


Figure 25-17. Le modèle admis pour expliquer la mise en place des polarités A/P et D/V par le même système de signalisation dans l'ovocyte de *Drosophila*. GRK est un ligand pour EGFR, un récepteur de tyrosine kinase. GRK est produit par l'ARNm localisé près du noyau de l'ovocyte. Au départ le noyau de l'ovocyte est localisé près du pôle postérieur et, par le signal transmis de GRK à EGFR, induit les cellules folliculaires les plus postérieures à adopter un devenir différent de celui des plus antérieures. Ceci provoque une réorganisation des microtubules et la localisation différentielle des ARNm de *bcd* et de *nos* le long de l'axe A/P. Le noyau de l'ovocyte migre alors et, a nouveau grâce au signal de GRK sur EGFR, induit localement les cellules proches à adopter un devenir dorso-antérieur, créant ainsi l'axe D/V. (Adapté de A. González-Reyes, H. Elliott et D. St. Johnston, *Nature* 375, 1995, 657.)

protéines BCD, HB-M et DL. Nous envisagerons ces processus dans la section suivante.

Message Des gradients de protéines établissent une polarité - c'est-à-dire définissent différentes positions - le long des axes A/P et D/V dans l'embryon de *Drosophila*.

La réponse initiale à l'information positionnelle

Comment, en tant que morphogènes, les protéines BCD, HB-M et DL agissent-elles pour fournir l'information positionnelle ? Nous verrons qu'elle déterminent l'expression localisée de protéines régulatrices (essentiellement des facteurs de transcription) qui, à leur tour, contrôlent l'expression localisée d'autres protéines régulatrices subsidiaires. Par plusieurs étapes de régulation, le mode d'expression localisée des protéines régulatrices finales devient de plus en plus précis, jusqu'à ce que tous les types de cellules essentielles soient définis par l'expression d'une constellation unique de protéines régulatrices.

BCD, HB-M et DL sont des facteurs de transcription et induisent, en fonction de leurs concentrations, l'expression d'un petit groupe de gènes régulateurs exprimés dans le zygote, appelés collectivement **gènes cardinaux** parce que ce sont les premiers gènes

BCU JAY CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tableau 25-2. Exemples de gènes agissant dans le zygote de *Drosophila* et contribuant au plan d'ébauche.

Symbole du gène	Nom du gène	Fonction de la protéine	Rôle(s) dans le développement précoce
Gènes de l'information de positionnement A/P :			
Gènes de l'axe A/P :			
hb-z	*hunchback-zygotic*	Facteur de transcription - protéine à doigt à zinc	Gène lacunaire
Kr	*Krüppel*	Facteur de transcription - protéine à doigt à zinc	Gène lacunaire
kni	*knirps*	Facteur de transcription - type de protéine récepteur de stéroïdes	Gène lacunaire
eve	*even-skipped*	Facteur de transcription - protéine à homéodomaine	Gène de la règle d'appariement
ftz	*fushi tarazu*	Facteur de transcription - protéine à homéodomaine	Gène de la règle d'appariement
opa	*odd-paired*	Facteur de transcription - protéine à doigt à zinc	Gène de la règle d'appariement
prd	*paired*	Facteur de transcription - protéine PHOX	Gène de la règle d'appariement
en	*engrailed*	Facteur de transcription - protéine à homéodomaine	Gène de polarité segmentaire
ci	*cubitus-interruptus*	Facteur de transcription - protéine à doigt à zinc	Gène de polarité segmentaire
wg	*wingless*	Protéine signal WG	Gène de polarité segmentaire
hh	*hedgehog*	Protéine signal HH	Gène de polarité segmentaire
fu	*fused*	Sérine-thréonine kinase cytoplasmique	Gène de polarité segmentaire
ptc	*patched*	Protéine transmembranaire	Gène de polarité segmentaire
arm	*armadillo*	Protéine de jonction cellule-cellule	Gène de polarité segmentaire
lab	*labial*	Facteur de transcription - protéine à homéodomaine	Gène de polarité segmentaire
Dfd	*Deformed*	Facteur de transcription - protéine à homéodomaine	Gène de polarité segmentaire
Antp	*Antennapedia*	Facteur de transcription - protéine à homéodomaine	Gène de polarité segmentaire
Ubx	*Ultrabithorax*	Facteur de transcription - protéine à homéodomaine	Gène de polarité segmentaire
Gènes de l'axe D/V :			
twi	*twist*	Facteur de transcription - protéine bHLH	Gène cardinal D/V
sna	*snail*	Facteur de transcription - protéine à doigt à zinc	Gène cardinal D/V
zen	*zerknüllt*	Facteur de transcription - protéine à homéodomaine	Gène cardinal D/V
dpp	*decapentaplegic*	Protéine signal DPP	Gène cardinal D/V
spi	*spitz*	Protéine signal SPI	Gène régulateur secondaire D/V
S	*Star*	Protéine transmembranaire	Gène régulateur secondaire D/V

à répondre à une information de positionnement fournie par la mère. Ces gènes cardinaux (Tableau 25-2) furent tout d'abord identifiés grâce aux allèles récessifs qui, chez des animaux mutants homozygotes, perdent une section entière de leur anatomie embryonnaire et larvaire A/P ou D/V (Figure 25-18 et 25-19). Les promoteurs des gènes cardinaux possèdent chacun des éléments amplificateurs reconnus par l'un ou l'autre morphogène, qui en active ou en réprime la transcription. Considérons quelques gènes appelés **gap (lacunaires)**, c'est-à-dire les gènes cardinaux de l'axe A/P. L'expression d'un de ces gènes cardinaux, *Krüppel (Kr)* est réprimée par un fort niveau du facteur de transcription BCD mais est favorisée par un faible niveau de BCD et d'HB-M. Au contraire, le gène *knirps (kni)* est réprimé par BCD mais exige pour son expression une faible concentration de facteur de transcription HB-M. Ces propriétés activatrices et promotrices assurent ainsi l'expression du gène *kni* ultérieurement à celle de *Kr* (Figure 25-20a).Ayant des promoteurs diversement sensibles aux concentrations d'un ou plusieurs morphogènes, les gènes cardinaux peuvent être exprimés selon une distribution qui commence à restreindre les devenirs cellulaires.

Affinement des décisions initiales du développement

Les gènes cardinaux dessinent un patchwork d'expressions de gènes qui préfigurent la configuration basale du plan corporel. Cependant, les schémas de l'expression sont trop grossiers pour déterminer tous les devenirs cellulaires nécessaires pour achever le schéma final de la larve. Tous les gènes cardinaux codent pour des protéines régulatrices (surtout des facteurs de transcription, la seule exception étant le ligand d'un récepteur transmembranaire de la classe des sérine/thréonine kinase). Grâce à des interactions entre facteurs et gènes cardinaux exprimés dans des règions adjacentes, leurs domaines d'expression sont réduits et affinés. Ainsi, dans la région dorsale de l'embryon, les gènes cardinaux *decapentaplegic (dpp)* et *zerknüllt (zen)* sont exprimés exactement dans les mêmes domaines du blastoderme cellulaire. Au travers d'interactions qui ne sont pas totalement comprises mais qui résultent de ce que différentes concentrations de la protéine DPP sont exprimées dans différentes cellules dorsales, *dpp* et *zen* sont produits de

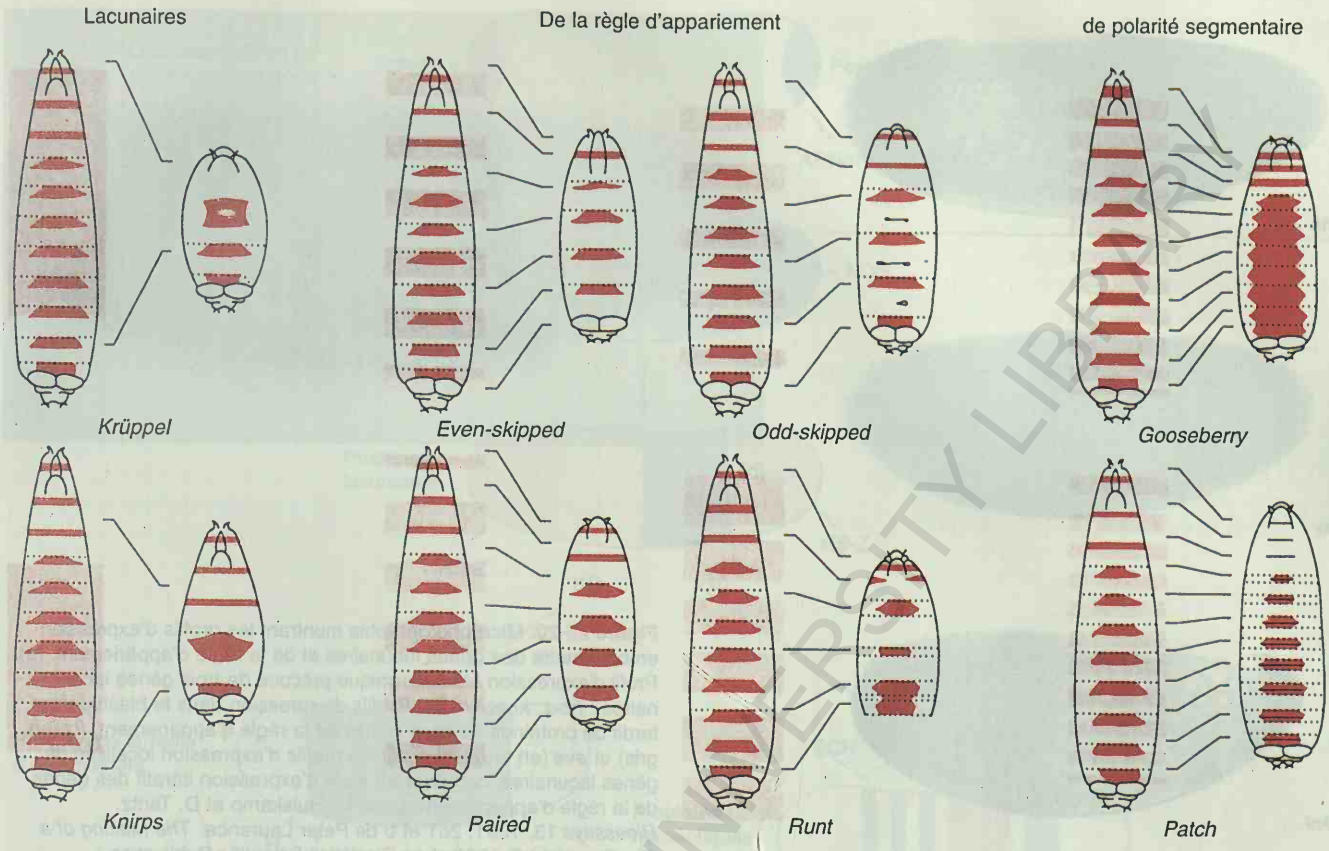
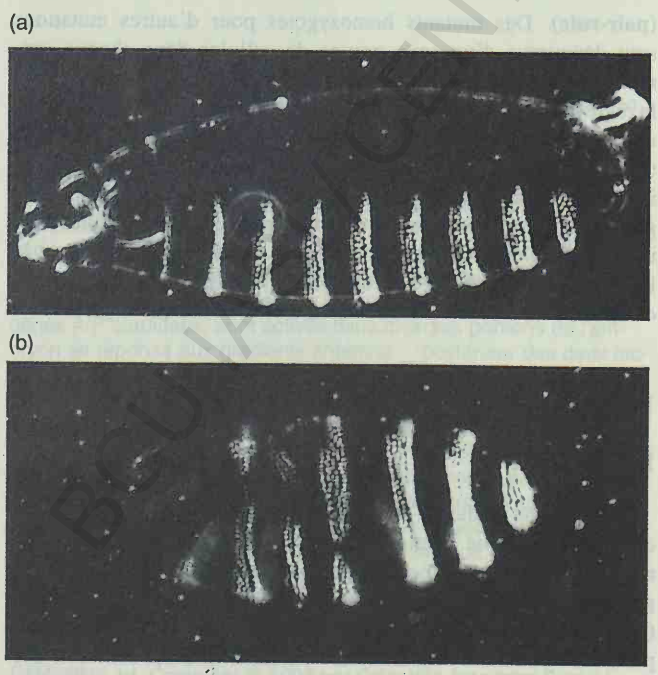


Figure 25-18. Diagrammes montrant les phénotypes de mutants de larves provoqués par des mutations dans les trois classes de gènes agissant dans le zygote pour contrôler le nombre de segments dans *Drosophila*, et des mutants représentatifs de chaque classe. Les régions denticulaires, figurées par des trapézoïdes rouges, se présentent sous formes de groupes d'appendices sur la face ventrale de l'exosquelette de la larve. La limite de chaque segment est représentée par le pointillé. A gauche, les régions rosées indiquent, sur le diagramme d'une larve sauvage, les domaines A/P manquants dans chaque mutant. Les diagrammes de droite sont les phénotypes mutants qui en résultent.



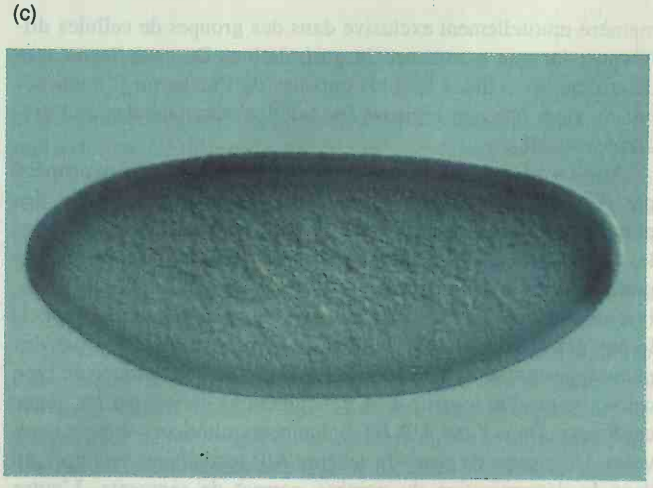


Figure 25-19. Le gène *dpp* (*decapentaplegic*) est un exemple de gène cardinal D/V de *Drosophila*. (a) Larve de type sauvage. A noter les bandes denticulaires sur la face ventrale. (b) Une larve mutante *dpp* (allèle) nul. A noter que les régions denticulaires entourent maintenant complètement l'embryon. (c) Schéma d'expression de l'ARNm *dpp* du blastoderme dans la moitié dorsale de l'embryon.

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

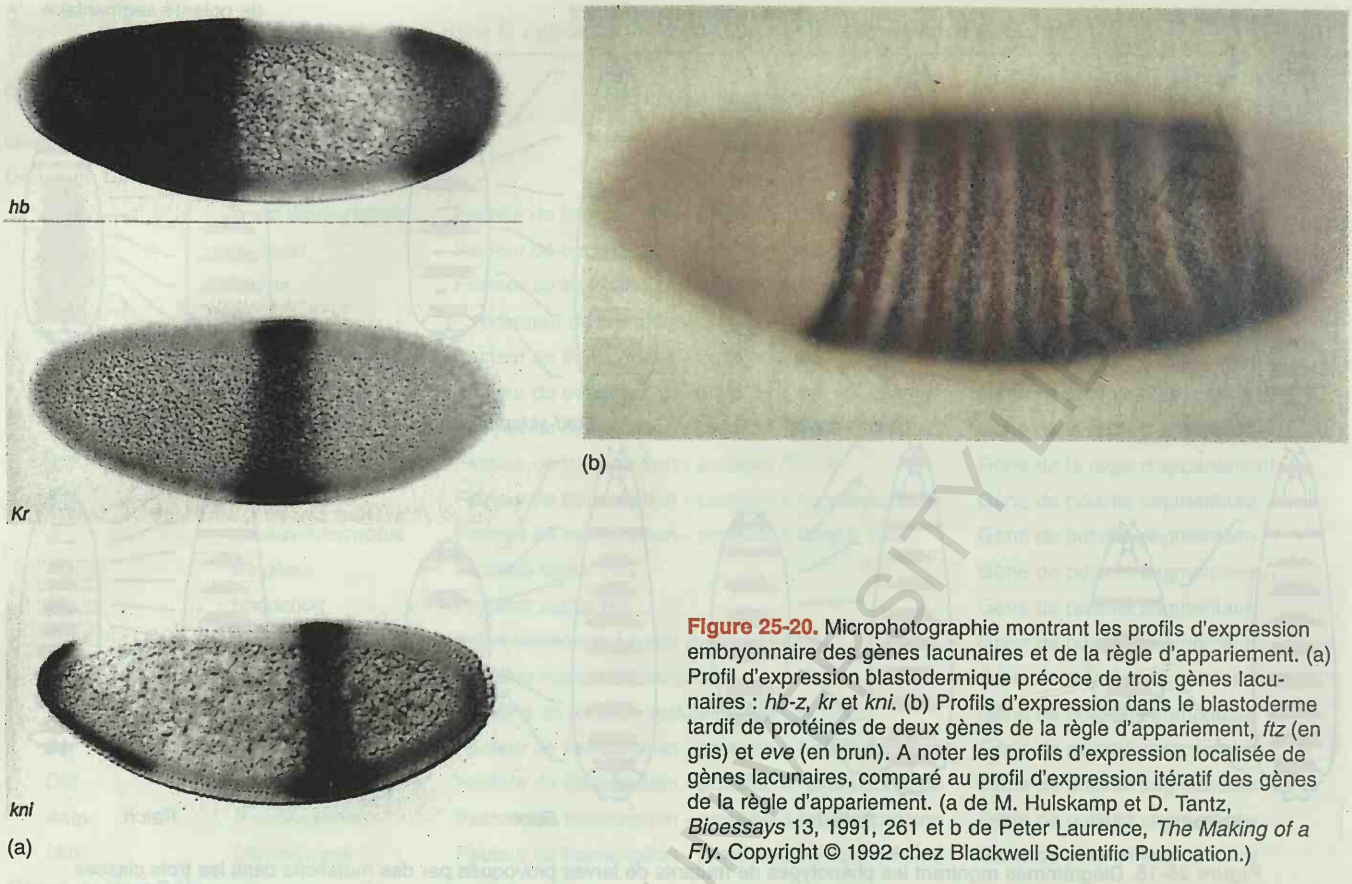


Figure 25-20. Microphotographie montrant les profils d'expression embryonnaire des gènes lacunaires et de la règle d'appariement. (a) Profil d'expression blastodermique précoce de trois gènes lacunaires : *hb-z*, *kr* et *kni*. (b) Profils d'expression dans le blastoderme tardif de protéines de deux gènes de la règle d'appariement, *ftz* (en gris) et *eve* (en brun). A noter les profils d'expression localisée de gènes lacunaires, comparé au profil d'expression itératif des gènes de la règle d'appariement. (a de M. Hulskamp et D. Tantz, *Bioessays* 13, 1991, 261 et b de Peter Laurence, *The Making of a Fly*. Copyright © 1992 chez Blackwell Scientific Publication.)

manière mutuellement exclusive dans des groupes de cellules différentes lorsque commence la gastrulation. De cette façon, *zen* détermine les cellules les plus dorsales de l'embryon (l'amnioséreuse), alors que *dpp* organise les cellules dorsolatérales de l'épiderme dorsal.

Après avoir fixé leur domaine respectif, les protéines exprimées par les gènes cardinaux provoquent l'expression localisée des **gènes régulateurs secondaires**. Comme pour les morphogènes et les gènes cardinaux, les premiers indices concernant la nature des gènes impliqués dans l'affinement du schéma sont venues de l'analyse de mutants. Le long de l'axe D/V ces gènes, que nous appellerons **gènes secondaires du schéma D/V** sont identifiés par des phénotypes mutants, dans lesquels manque un sous-groupe de type cellulaire produit à partir d'un des domaines définis par les gènes cardinaux. Dans l'axe A/P, les événements ultérieurs suivent deux voies. Un groupe de gènes du schéma A/P secondaires est impliqué dans la détermination du nombre correct de segments. L'autre groupe intervient dans la détermination de l'identité de chaque segment (c'est-à-dire le type de segment qui se formera).

Ces gènes déterminant le nombre de segments sont reconnus par des mutations qui provoquent une délétion de matériel segmentaire de manière itérative (Figure 25-18). Des mutants homozygotes pour certains de ces gènes ont la moitié du nombre normal de segments et sont appelés mutants **de la règle d'appariement (pair-rule)**. Des mutants homozygotes pour d'autres mutations sont dépourvus d'un sous groupe de cellules dans chaque segments, ce sont les mutants **de polarité segmentaire**. Les gènes de la règle d'appariement sont exprimés en un profil à sept raies, définissant ainsi des domaines ayant à peu près la largeur d'un segment (Figure 25-20b). Ces gènes de la règle d'appariement contribuent à définir la localisation et la taille des segments. Les produits des gènes de polarité sont exprimés en 14 raies, chacune d'elles correspondant à un sous-ensemble de cellules de chaque segment le long de l'axe A/P. Les gènes de polarité contribuent à la définition des positions discrètes des cellules au sein de chaque segment.

Une cascade d'événements régulateurs

Nous avons vu dans l'élaboration des segments A/P et des types cellulaires D/V que l'action précédente d'un groupe de molécules régulatrices dans un type de domaine conduit à la définition progressive de subdivisions de plus en plus précises dans l'embryon. (La Figure 25-21 résume cette progression pour l'axe A/P). La plupart des éléments déterminant les chemins initiaux sont soit des facteurs de transcription eux-mêmes soit des signaux de cellule à

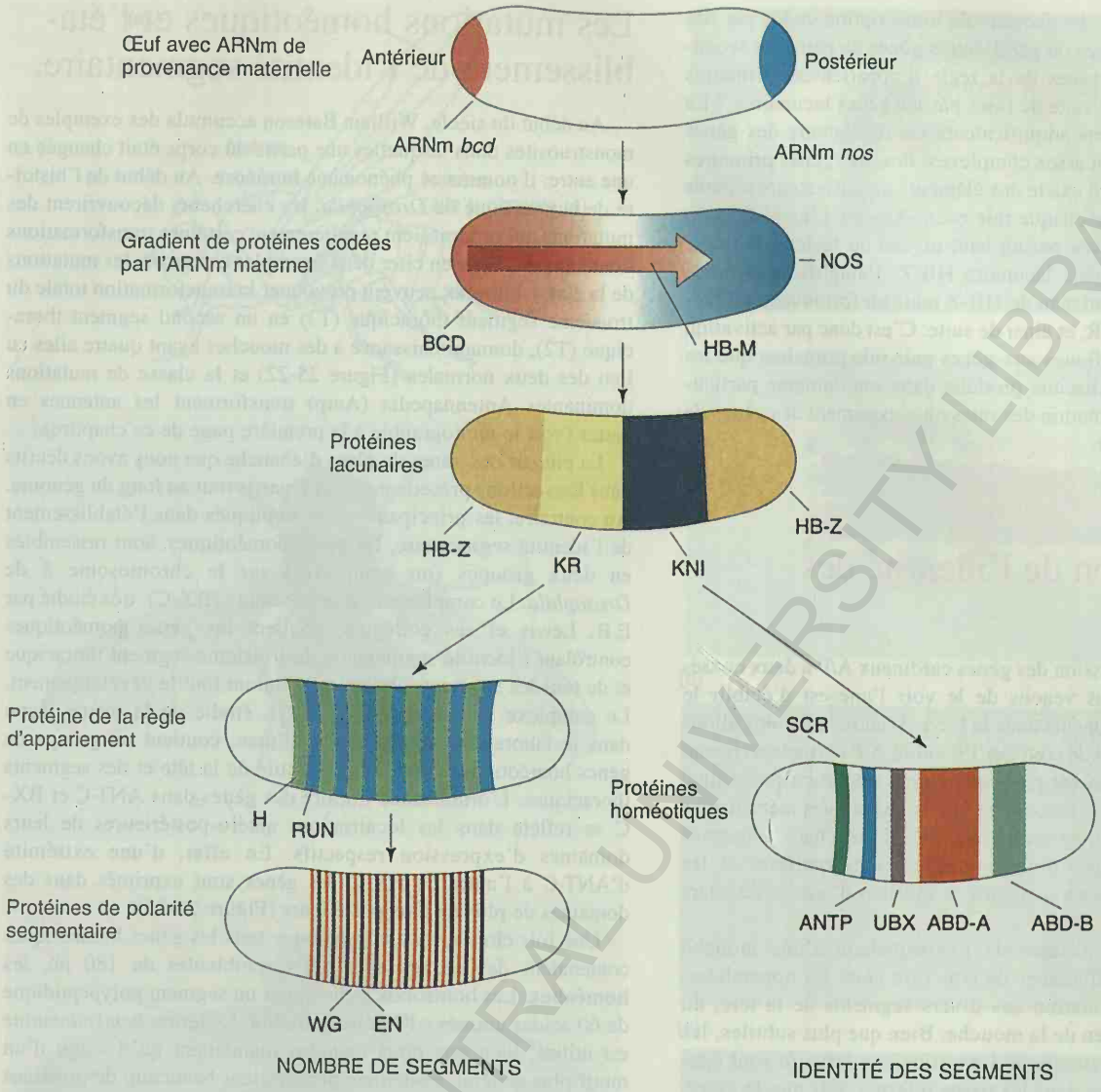


Figure 25-21. Représentation schématique de la cascade hiérarchisée qui active les éléments responsables du profil de segmentation A/P dans *Drosophila*. Les ARNm *bcd* et *nos*, dérivés de la mère, sont localisés respectivement aux pôles antérieur et postérieur. Lors de l'embryogenèse précoce ces ARNm sont traduits pour produire un gradient antérieur → postérieur assez raide du facteur de transcription BCD. Le gradient postérieur → antérieur de Nos inhibe la traduction de l'ARNm *hb-m*, créant ainsi un gradient antérieur → postérieur plus atténué pour le facteur de transcription HB-M (représenté par une flèche). Les gènes lacunaires (ou gap), qui sont les gènes A/P cardinaux, sont activés dans diverses portions de l'embryon en réponse aux gradients antérieur → postérieur des deux facteurs BCD et HB-M. (L'expression de HB-M dans la bande postérieure donne naissance à certains organes internes, pas à des segments.) Le nombre exact de segments est déterminé par l'activation des gènes de la règle d'appariement (ou pair-rule) en raies successives en réponse aux facteurs de transcription codés par les gènes lacunaires. Les gènes de polarité segmentaire sont alors activés en réponse aux activités de plusieurs protéines issues des gènes de la règle d'appariement, affinant ainsi l'organisation de chaque segment. L'identité correcte des segments est déterminée par l'expression des gènes homéotiques résultant de leur régulation directe par les facteurs de transcription issus des gènes lacunaires. (Modifié de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski et M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2ième éd. Copyright © 1992 par Scientific American Books.)

cellule qui conduisent à l'activation différentielle de facteurs de transcription. Ce thème semble être maintenu tout au long du processus que nous avons décrit. Jusqu'à l'intervention des gènes de polarité segmentaire, toutes les fonctions codées sont impliquées dans la régulation de transcription ou dans des signaux intercellulaires. De ce point de vue, nous pouvons regarder les signaux intercellulaires comme un mécanisme qui permet à différentes cellules de coordonner leurs activités de transcription.

Il est frappant de constater qu'au cours des premières étapes dans l'élaboration d'un plan d'ébauche, un mode d'expression génétique itératif - l'activation des sept raies d'expression de chaque gène pair-rule- est, d'une manière ou d'une autre, déterminée par l'expression asymétrique et localisée de plusieurs gènes lacunaires. Comme c'est souvent le cas, nous avons peu d'idées sur la manière dont un tel système a pu apparaître au cours de l'évolution, mais voici comment il fonctionne. Nous pouvons définir deux sous-classes de gènes de la règle d'appariement: primaire et secondaire. Les gènes pair-rule primaires - le gène even-skipped est l'un d'eux- sont activés directement par les facteurs de transcription codés par les gènes lacunaires. Les gènes pair-rule secon-

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

daires sont activés par des facteurs de transcription codés par des gènes pair-rule primaires ou par d'autres gènes de pair-rule secondaires. Comment les gènes de la règle d'appariement primaires sont-ils activés en une suite de raies par les gènes lacunaires ? La clé est que les éléments amplificateurs cis-régulateurs des gènes pair-rule primaires sont assez complexes. Pour les gènes primaires comme even-skipped, il existe des éléments amplificateurs séparés régulant l'activation de chaque raie even-skipped. L'amplification de la rayure 1 est activée par un haut niveau du facteur de transcription codé par le gène lacunaire HB-Z, l'amplification de la rayure 2 par un faible niveau de HB-Z mais un fort niveau du facteur de transcription KR, et ainsi de suite. C'est donc par activation d'amplificateurs spécifiques aux gènes pair-rule primaires que les protéines lacunaires, chacune produite dans son domaine particulier, provoquent la formation des raies où s'expriment des gènes de la règle d'appariement.

Détermination de l'identité des segments

Le schéma d'expression des gènes cardinaux A/P a deux conséquences. Comme nous venons de le voir l'une est d'établir le nombre correct de segments dans la larve. L'autre, que nous allons maintenant décrire, est de conférer l'identité A/P correcte à chacun des segments. Ce sujet est particulièrement important parce que, comme nous le verrons, il souligne que beaucoup des mécanismes du schéma de formation sont d'apparition ancienne, conservés chez des animaux aussi divergents que les mammifères et les mouches durant plusieurs centaines de millions d'années au cours de l'évolution.

Même un simple examen de l'exosquelette d'une mouche adulte montre des différences de structure entre les appendices, les poils et la pigmentation des divers segments de la tête, du thorax et de l'abdomen de la mouche. Bien que plus subtiles, les différences dans l'anatomie de l'exosquelette larvaire sont également claires. Mêmes dans les tissus internes, tels que le système nerveux central et l'intestin, il y a des subdivisions segmentaires. La possibilité d'analyser les phénotypes de mutations de gènes contrôlant l'identité segmentaire s'est révélée précieuse.

Les **gènes homéotiques** sont les déterminants primaires de l'identité segmentaire. Des mutations dans ces gènes homéotiques changent l'identité d'un ou plusieurs segments, sans altérer leur nombre. Chez les animaux montrant des phénotypes homéotiques mutants, le nombre de segments est exactement le même que dans le type sauvage, mais un ou plusieurs de ces segments ont transformé leur schéma de structure en copies supplémentaires qui sont plus antérieures ou plus postérieures que dans le plan corporel du type sauvage. Tous les gènes homéotiques codent pour des facteurs de transcription. Nous en dirons plus à la fin de ce chapitre au sujet de la fonction et de l'évolution des gènes homéotiques et de leurs protéines.

Différents gènes homéotiques sont exprimés à différentes positions au long de l'axe A/P de l'embryon. Les schémas d'expression des divers gènes lacunaires déterminent le schéma spatial d'expression des gènes homéotiques (Figure 25-21).

Les mutations homéotiques et l'établissement de l'identité segmentaire.

Au début du siècle, William Bateson accumula des exemples de monstruosités dans lesquelles une partie du corps était changée en une autre; il nomma ce phénomène **homéose**. Au début de l'histoire de la génétique de *Drosophila*, les chercheurs découvrirent des mutations qui produisaient régulièrement certaines transformations homéotiques. Pour en citer deux exemples extrêmes, les mutations de la classe bithorax peuvent provoquer la transformation totale du troisième segment thoracique (T3) en un second segment thoracique (T2), donnant naissance à des mouches ayant quatre ailes au lieu des deux normales (Figure 25-22) et la classe de mutations dominantes Antennapedia (Antp) transforment les antennes en pattes (voir la photographie à la première page de ce chapitre).

La plupart des gènes de plans d'ébauche que nous avons décrits dans les sections précédentes sont répartis tout au long du génome. Au contraire, les principaux gènes impliqués dans l'établissement de l'identité segmentaire, les gènes homéotiques, sont rassemblés en deux groupes (ou complexes) sur le chromosome 3 de *Drosophila*. Le complexe de gènes bithorax (BX-C), très étudié par E.B. Lewis et ses collègues, contient les gènes homéotiques contrôlant l'identité segmentaire du troisième segment thoracique et de tous les segments abdominaux durant tout le développement. Le complexe Antennapedia (ANT-C), étudié de la même façon dans le laboratoire de Thomas Kaufman, contient un groupe de gènes homéotiques contrôlant l'identité de la tête et des segments thoraciques. L'ordonnance linéaire des gènes dans ANT-C et BX-C se reflète dans les localisations antéro-postérieures de leurs domaines d'expression respectifs. En effet, d'une extrémité d'ANT-C à l'autre de BX-C, les gènes sont exprimés dans des domaines de plus en plus postérieurs (Figure 25-23).

Une fois clonés, on a constaté que tous les gènes homéotiques contenaient des séquences d'ADN semblables de 180 pb, les **homéobox**. Les homéobox codent pour un segment polypeptidique de 60 acides aminés - l'**homéodomaine**. Le terme *homéodomaine* est utilisé, bien que nous sachions maintenant qu'il s'agit d'un motif plus général, également présent dans beaucoup de protéines non codées par des gènes homéotiques. L'homéodomaine est la région de la protéine qui se lie à l'ADN de manière séquence-spécifique et ainsi active ou réprime la transcription de gènes cibles bien précis (voir le chapitre 18 pour une discussion précisant la manière dont l'homéodomaine se fixe à l'ADN).

Il existe une progression entre les phénotypes provoqués par les mutations ANT-C et BX-C (Figure 25-24). Par exemple, une larve homozygote pour une mutation nulle (totale) d'Abd-B exhibe une transformation de ce que sont ordinairement les cinquième au huitième segments (A5-A8) en copies réitérées du quatrième segment (A4). Un double homozygote nul pour abd-A et Abd-B montre une transformation plus importante, dans laquelle les segments A2 à A8 sont transformés chacun en segments indistinguables du A1 normal. Finalement un triple homozygote nul pour l'ensemble BX-C où les trois gènes homéotiques Ubx,abd-A et Abd-B font défaut, transforme les segments T3 à A8 en autant de copies de T2.

Comment les gènes ANT-C et BX-C sont-ils activés au bon endroit ? Comme décrit précédemment dans ce chapitre, ils sont régulés par les gènes cardinaux A/P; de plus, les gènes homéotiques sont capables de se réguler mutuellement. Ces niveaux mul-

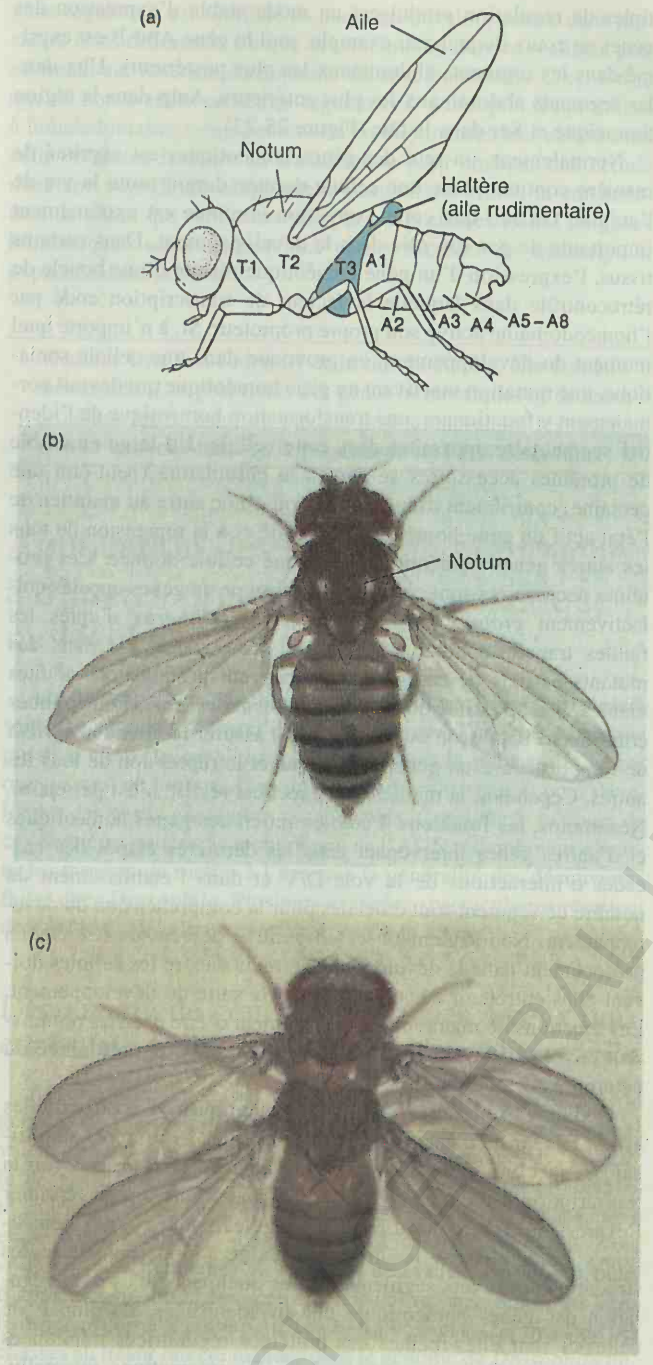


Figure 25-22. La transformation homéotique du troisième segment thoracique (T3) de *Drosophila* en un second segment thoracique (T2) supplémentaire. (a) Diagramme montrant les segments thoraciques et abdominaux normaux. A noter la structure d'aile rudimentaire normalement dérivée de T3. L'essentiel du thorax de la mouche, y compris les ailes et la partie dorsale du thorax, proviennent de T2. (b) Une mouche de type sauvage avec une copie de T2 et une de T3. (c) Un triple mutant bithorax homozygote transforme complètement T3 en une seconde copie de T2. A noter le deuxième thorax dorsal et la seconde paire d'ailes (structures T2) et l'absence d'haltères (structures T3). (D'après E. B. Lewis, *Nature* 276, 1978, 565. Les photographies sont dues à l'amabilité de E. B. Lewis. Reproduit avec l'autorisation de *Nature*. Copyright © 1978 de Macmillan Journals Ltd.)

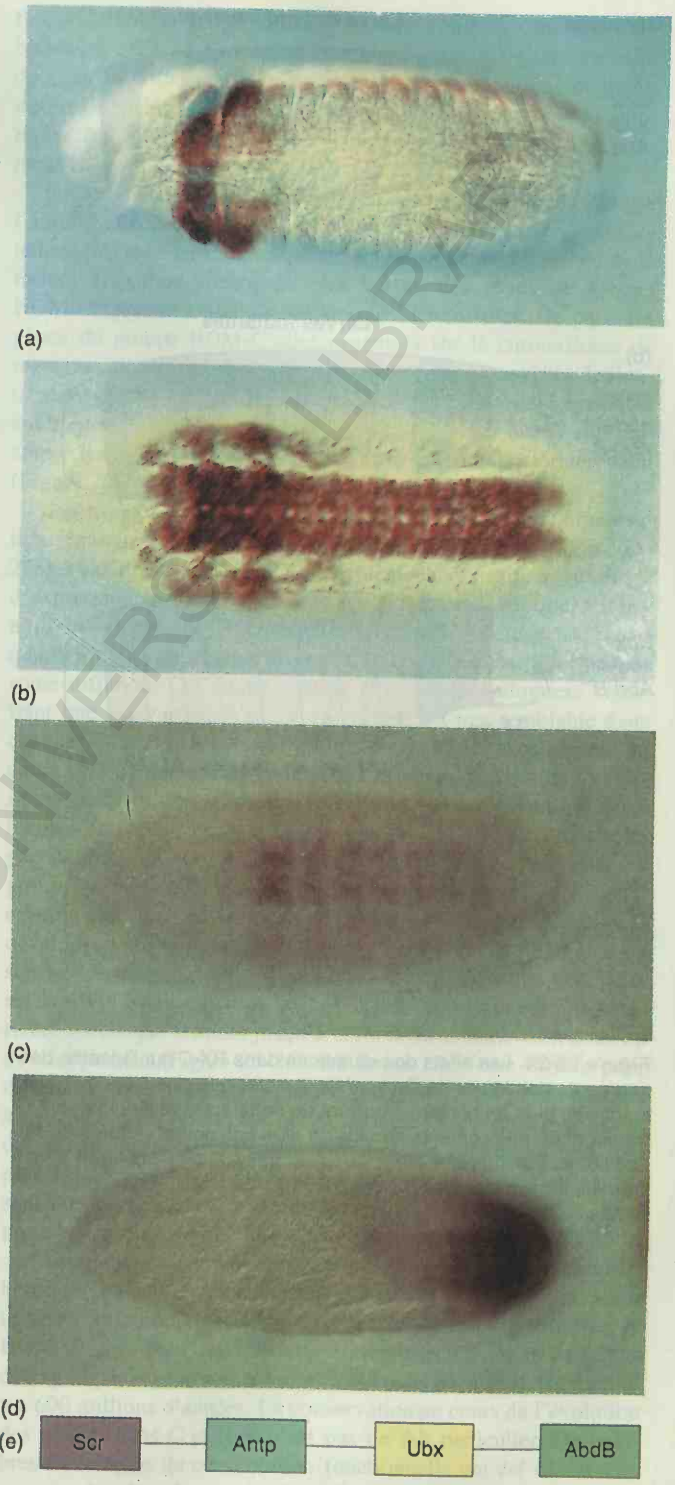


Figure 25-23. Microphotographies d'embryons montrant les modes d'expression de gènes de protéines homéotiques dans *Drosophila*. (a) SCR ; (b) ANTC ; (c) UBX ; (d) ABD-B. A noter que la limite antérieure d'expression du gène homéotique se déplace de SCR (la plus antérieure) à ANTP, UBX et ABD-B (la plus postérieure). (c) Cet ordre est reflété par un arrangement linéaire des gènes correspondants le long du chromosome 3. Les photos a et b sont de T. Kaufman, Indiana University. Les photos c et d sont de S. Celniker et E. B. Lewis, California Institute of Technology.)

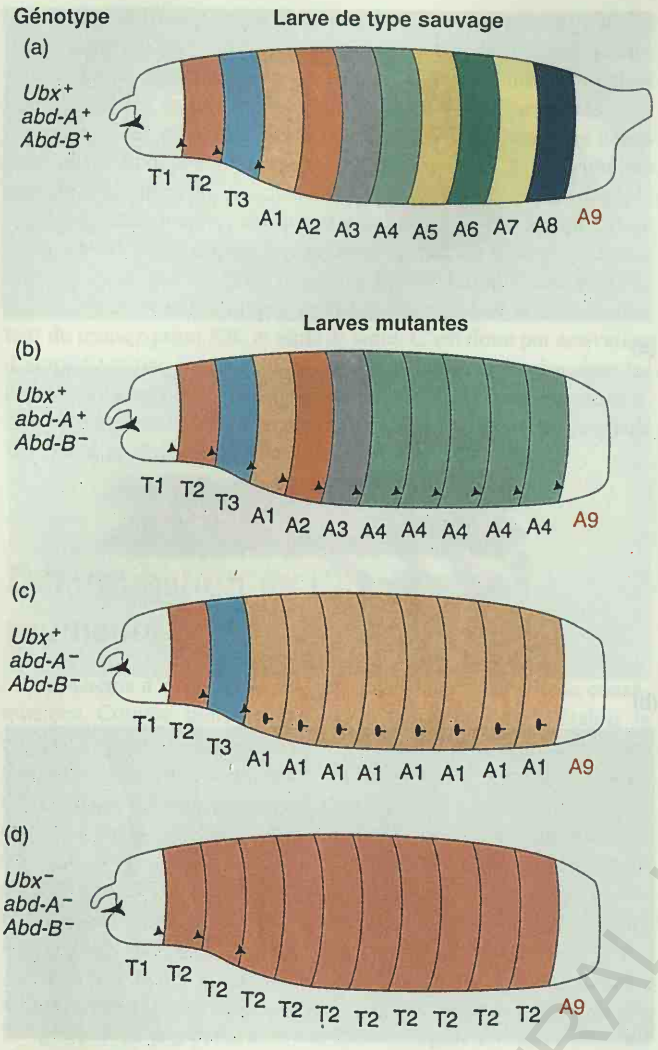


Figure 25-24. Les effets des mutations dans BX-C sur l'identité des segments des larves de *Drosophila*. A noter que plus il y a de gènes inactivés, plus un nombre croissant de segments postérieurs sont transformés en segments de plus en plus antérieurs. (Adapté de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et S. Darnell, *Moleculear Cell Biology*, 3ième éd. Scientific American Books, 1995.)

tiples de régulation produisent un mode stable d'expression des gènes au cours duquel, par exemple, seul le gène Abd-B est exprimé dans les segments abdominaux les plus postérieurs, Ubx dans les segments abdominaux les plus antérieurs, Antp dans la région thoracique et Scr dans la tête (Figure 25-23).

Normalement, un seul des gènes homéotiques est exprimé de manière continue dans une cellule donnée durant toute la vie de l'animal. On sait que cette expression continue est extrêmement importante de par son rôle dans le développement. Dans certains tissus, l'expression d'un gène homéotique résulte d'une boucle de rétrocontrôle dans laquelle le facteur de transcription codé par l'homéodomaine active son propre promoteur. Si, à n'importe quel moment du développement, on provoque dans une cellule somatique, une mutation inactivant un gène homéotique qui devrait normalement y fonctionner, une transformation homéotique de l'identité segmentaire apparaîtra dans cette cellule. Un large ensemble de protéines accessoires se liant à la chromatine (peut-être une centaine) contribuent d'une manière ou d'une autre au maintien de l'état actif du gène homéotique exprimé et à la répression de tous les autres gènes homéotiques dans une cellule donnée. Ces protéines accessoires sont codées par un groupe de gènes appelés collectivement *groupe Polycomb* et *groupe trithorax* d'après les faibles transformations homéotiques qui apparaissent dans des mutants partiels de ces gènes, qui peuvent produire des adultes viables. Il est possible que le regroupement des gènes homéotiques contribue d'une façon ou d'une autre à assurer le maintien correct de l'expression d'un gène homéotique et la répression de tous les autres. Cependant la manière dont ceci est réalisé n'est pas claire. Néanmoins, les fonctions d'auto-entretien des gènes homéotiques et d'autres gènes intervenant dans les dernières étapes des cascades d'interactions de la voie D/V et dans l'établissement du nombre de segment sont cruciales pour la compréhension du développement. Non seulement les «devenirs» doivent-ils être établis précocement dans le développement, mais encore les cellules doivent-elles entretenir ces états pendant la suite du développement. Les fonctions de maintenance qui viennent d'être décrites remplissent ce rôle et sont une part importante de la base moléculaire du déterminisme cellulaire.

Que font les protéines des gènes homéotiques ? Chacune d'elles est un facteur de transcription pouvant se lier à différents amplificateurs spécifiques de tissus, dans certains cas pour promouvoir la transcription d'un gène spécifique et dans d'autres pour réprimer l'expression d'un gène. Les gènes régulés par les gènes homéotiques accomplissent les fonctions exigées pour construire les structures des divers segments. Seules quelques cibles de la régulation des gènes homéotiques ont été identifiées. La plupart de celles-ci sont elles-mêmes des protéines régulatrices impliquées dans le contrôle transcriptionnel ou les interactions intercellulaires. Ainsi, il est probable qu'il y a d'autres événements régulateurs qui interviennent après l'entrée en jeu des gènes homéotiques pour définir le destin de toutes les cellules d'un segment donné.

Les gènes homéotiques sont exprimés dans de nombreux tissus différents tout au long de la vie de la mouche. Dans ces différents tissus, les diverses protéines à homéodomaines activent ou répriment différentes batteries de gènes. Ceci est un des nombreux exemples d'un principe de développement important -le même

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

gène régulateur est réutilisé au cours du développement dans plusieurs rôles différents. Ce que la protéine régulatrice réalisera précisément est fonction du contexte de développement. C'est-à-dire que de nombreuses protéines régulatrices, y compris les protéines à homéodomaine, conjugueront ou coordonneront leur action avec celles d'autres facteurs de transcription pour engager une cellule dans une voie de développement particulière. Ainsi, la constellation de gènes qui sera contrôlée par les protéines issues de gènes homéotiques sera fonction des autres facteurs de transcription exprimés dans la cellule.

Message Une fois l'identité de la cellule établie, elle doit être mémorisée. Les propriétés des gènes homéotiques et de leurs protéines fournissent un modèle pour comprendre les mécanismes qui sous-tendent la persistance de l'état déterminé.

Application des leçons de la mouche à d'autres organismes : la génétique moléculaire de la souris.

Les principes du développement découverts chez *Drosophila* sont-ils universels ? Jusqu'il y a peu, le type d'analyse génétique possible chez *Drosophila* ne l'était pas dans la plupart des autres organismes, en tout cas sans un énorme investissement pour développer des outils génétiques comparables. Cependant, au cours de ces dernières années, la technologie de l'ADN recombinant a fourni les moyens de mettre à l'épreuve la généralité des découvertes faites chez *Drosophila*. Plusieurs avancées spectaculaires résultent de l'étude du développement précoce de la souris.

Découverte de gènes homologues à ceux qui contrôlent le développement chez *Drosophila*

Avec la découverte de nombreux gènes à homéobox dans le génome de *Drosophila*, les similitudes entre leurs séquences pouvaient servir d'outil pour rechercher d'autres membres de la famille de gènes homéotiques. Cette recherche dépend de la complémentarité entre les bases de l'ADN. Dans ce but, des hybridations entre ADN différents sont réalisées dans des conditions dites « d'exigences modérées » au cours desquelles certains défauts d'appariement entre bases peuvent apparaître sans rompre les liens hydrogène corrects entre paires de bases voisines. Certaines de ces chasses au trésor ont été menées dans le génome de *Drosophila* lui-même pour rechercher *davantage* de membres de la famille. D'autres ont consisté à chercher des gènes homéobox dans d'autres animaux par la technique de Southern (voir chapitre 14), en utilisant de l'ADN radioactif de *Drosophila* comme sonde. Cette approche a conduit à la découverte de séquences homologues d'homéobox chez de nombreux animaux, y compris l'homme et la souris. (Cette technique est en effet très efficace pour « pêcher » les séquences apparentées à n'importe quel gène dans votre organisme favori). Certains gènes homéobox de mammifères sont très semblables à ceux de *Drosophila*. Le cas le plus marquant est sans doute la similitude entre les groupes de gènes homéobox de mammifères appelés *complexe HOX* et les groupes de gènes homéotiques ANT-C et BX-C d'insectes, maintenant appelé collectivement HOM-C (« homéotic gene complex ») (Figure 25-25).

Les groupes ANT-C et BX-C, qui sont assez éloignés l'un de l'autre sur le chromosome 3 de *Drosophila melanogaster*, sont fortement liés chez les insectes plus primitifs comme le scarabée de la farine, *Tribolium castaneum*. La liaison des gènes du groupe HOM-C apparaît comme générale chez les insectes. De plus, les gènes du groupe HOM-C sont organisés sur le chromosome de manière colinéaire à leur expression anatomique: les gènes de l'extrémité gauche du complexe sont transcrits près de l'extrémité antérieure de l'embryon; allant de gauche à droite sur le chromosome, les gènes sont transcrits de plus en plus postérieurement (Figure 25-25a).

Les groupes HOX de la souris et de l'homme ont une organisation similaire à celle du groupe HOM-C des insectes (Figure 25-25a). La carte des gènes HOX est également colinéaire à leur mode d'expression anatomique. La différence essentielle est que, s'il n'y a qu'un seul groupe HOM-C dans le génome des insectes, il y a quatre groupes HOX chez les mammifères, chacun sur un chromosome différent. Ces quatre groupe Hox sont «paralogues» signifiant que la structure (l'ordre des gènes) est très semblable dans chaque groupe, comme si le groupe entier avait été quadruplé au cours de l'évolution des vertébrés. Les gènes proches de l'extrémité gauche de chaque groupe HOX sont non seulement très semblables entre eux mais aussi aux gènes HOM-C de l'extrémité gauche chez les insectes. Ce type de relation vaut pour tous les groupes examinés. Constatation frappante, les gènes HOX sont exprimés de manière segmentaire dans les somites en cours de développement et dans le système nerveux central de l'embryon de souris (très probablement chez l'homme aussi). Chaque gène Hox est exprimé comme un bloc continu commençant à une limite antérieure spécifique et allant jusqu'à la fin de la colonne vertébrale en développement (Figure 25-26). La limite antérieure diffère pour différents gènes Hox. Dans chaque groupe Hox les gènes les plus à gauche ont les limites les plus antérieures. Ces limites avancent de plus en plus postérieurement à mesure que les groupes Hox sont plus à droite sur la carte. Ainsi, les groupes de gènes Hox paraissent être organisés et exprimés dans un ordre parfaitement identique à celui des gènes HOM-C chez les insectes (Figure 25-25b).

Comment des organismes aussi divers -mouche, souris, homme- peuvent-ils présenter des séquences de gènes aussi similaires? L'interprétation la plus simple est que les gènes Hox et HOM-C sont, pour les vertébrés et les insectes, les descendants d'un groupe de gène homéobox présent dans un ancêtre commun il y a 600 millions d'années. La conservation au cours de l'évolution des gènes HOM-C et Hox n'est pas un fait particulier. De nombreux exemples de conservation fonctionnelle ont été découverts comme chez les gènes *aniridia* de la souris et *Drosophila eyeless* représentés sur la couverture de ce livre. C'est parfois le cas aussi pour des voies de différenciation complètes; pour ne donner qu'un exemple, la voie d'activation du morphogène DL de *Drosophila*

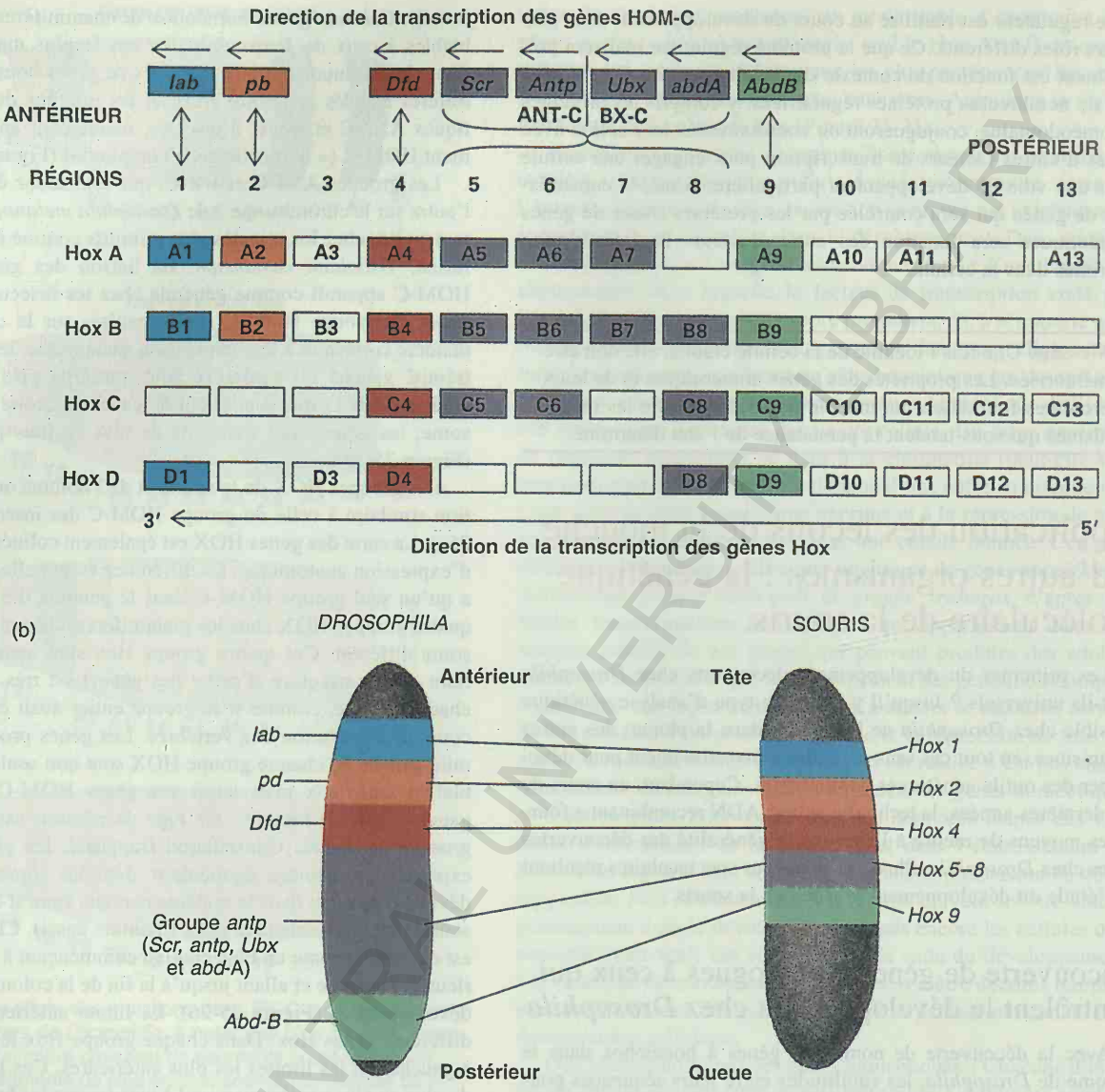


Figure 25-25. Comparaison des structures et fonctions des gènes homéotiques d'insectes et de mammifères. (a) Anatomie comparée des groupes de gènes HOM-C et Hox. Les gènes de HOM-C sont présentés en haut. Chacun des quatre groupes Hox paralogues (voir texte) sont situés sur un chromosome différent. Les gènes colorés de façon identique sont plus apparentés quant à leur structure et leur fonction. (b) Les domaines et régions d'expression des embryons de *Drosophila* et de la souris qui exigent les divers HOM-C et gènes Hox. Les couleurs sont équivalentes à celles de la partie a. A noter que l'ordre des domaines est le même dans les deux embryons. (Adapté de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et S. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Scientific American Books, 1995.)

est très semblable à celle de la protéine NF-κB, le facteur de transcription se liant à l'amplificateur du gène de l'immunoglobine décrit au chapitre 23 (Figure 25-27). D'autres exemples de conservation entre gènes intervenant dans l'élaboration du plan corporel sont énumérés dans le Tableau 25-3.

Message La parenté entre HOM-C et Hox et bien d'autres similitudes découvertes ces dernières années, montre que beaucoup de gènes jouant un rôle important dans le développement ont été très conservés au cours de l'évolution animale

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

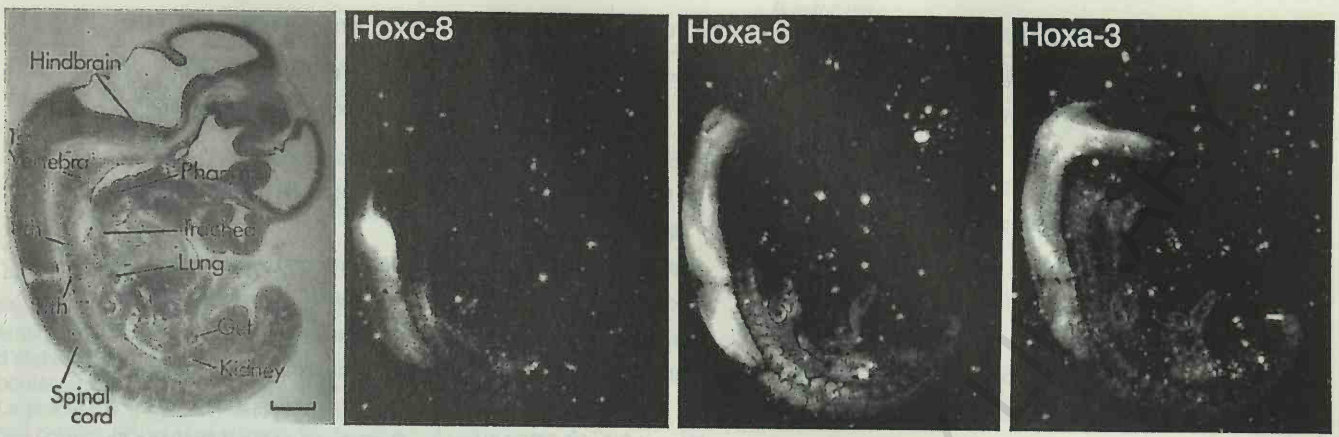


Figure 25-26. Microphotographies montrant les modes d'expression de l'ARN de trois gènes Hox de la souris dans la colonne vertébrale telles qu'elles apparaissent dans des sections d'embryons de souris âgés de 12,5 jours. A noter que la limite antérieure de chaque région d'expression est différente. (De S. J. Gaunt et P. B. Singh, *Trends in Genetics*, 6, 1990, 208.)

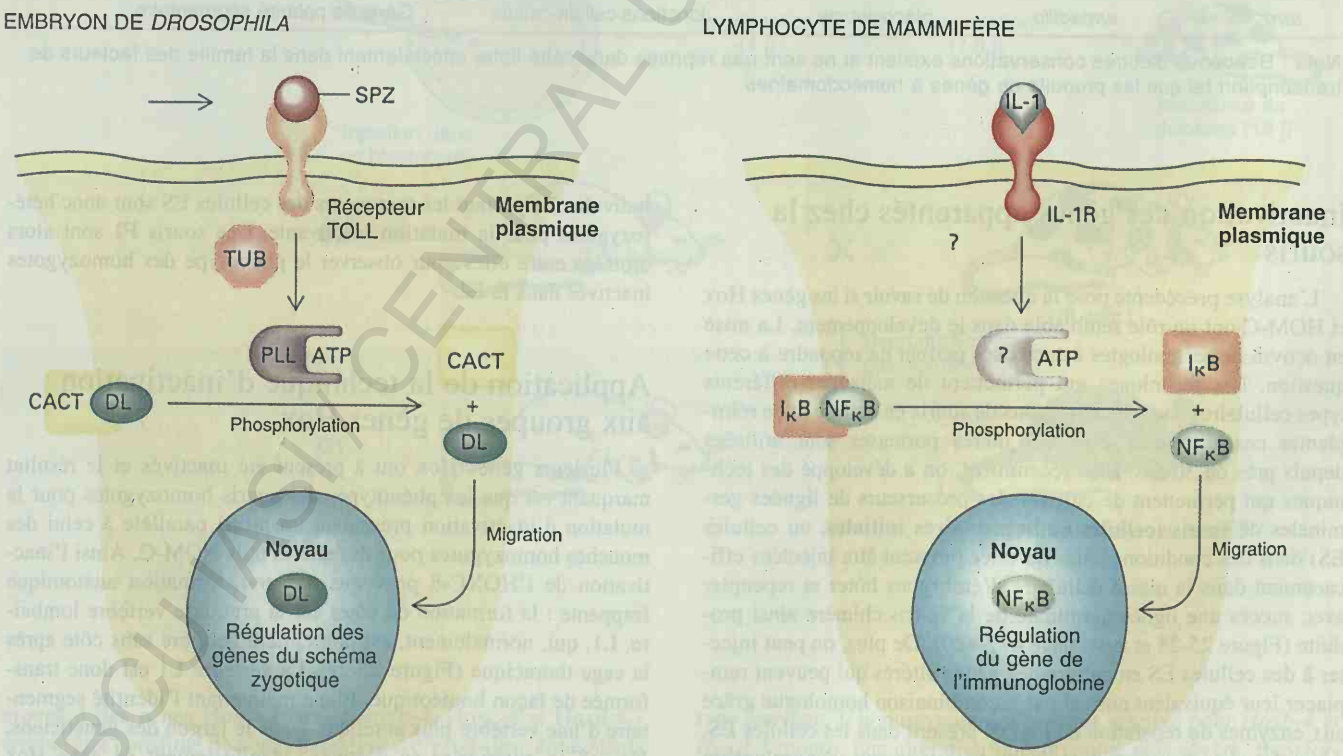


Figure 25-27. La voie d'activation du morphogène DL de *Drosophila* est parallèle à celle de l'activation, chez le mammifère, de NF-$_\kappa$B, le facteur de transcription qui active les amplificateurs des gènes d'immunoglobuline. (Voir chapitre 23 pour une discussion de la régulation des gènes d'immunoglobuline). Il y a des similitudes de structures protéiques entre SPZ et IL-1, TOLL et IL-1R, CACT et I-$_\kappa$B et DL et NF-$_\kappa$B. (Adapté de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira et S. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ième éd. Scientific American Books, 1995.)

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY

Tableau 25-3. Exemples de gènes contribuant au plan d'ébauche de *Drosophila* et conservés au cours de l'évolution.

Symbole des gènes de *Drosophila*	Nom des gènes de *Drosophila*	Equivalent(s) mammalien(s)	Fonction de la protéine	Rôle(s) au cours du développement précoce
dl	*dorsal*	NF-$_\kappa$B	Facteur de transcription de DL	morphogène D/V
cact	*cactus*	I$_\kappa$B	Se fixe à la protéine DL dans le cytoplasme	Régulateur du morphogène D/V
spz	*spätzle*	IL-1	Signal SPZ	Régulateur du morphogène D/V
Tl	*Toll*	récepteur de IL-1	Récepteur de SPZ	Régulateur du morphogène D/V
snk	*Snake*	nombreux	Sérine protéase	Active la protéine *spz*
dpp	*decapentaplegic*	BMP2, BMP4	Signal DPP	Gène cardinal de l'ectoderme dorsal
sax	*saxophone*		Récepteur sérine/thréonine kinase de DPP	Contribue au plan d'ébauche de l'ectoderme dorsal
tkv	*thick veins*	BRK		
pnt	*punt*			
sog	*short gastrulation*	chordine	Signal SOG	Contribue au plan d'ébauche ectodermique
spi	*spitz*	TGF-α	Signal SPI	Gène régulateur secondaire pour l'ectoderme ventral
grk	*gurken*	EGF	Signal GRK	Signal de polarité D/V et A/P
Egfr	*EGF receptor*	EGFR	Récepteur tyrosine kinase pour SPI et GRK	Polarité D/V et A/P et plan d'ébauche de l'ectoderme ventral
en	*engrailed*	En1, En2	Protéine à homéodomaine	Gène de polarité segmentaire
hh	*hedgehog*	Sonic hedgehog	Signal dHH	Gène de polarité segmentaire
wg	*wingless*	Wnt1, Wnt2, etc.	Signal WG	Gène de polarité segmentaire
arm	*armadillo*	placoglobine	Jonctions cellule-cellule	Gène de polarité segmentaire

Note : Beaucoup d'autres conservations existent et ne sont pas reprises dans cette liste, spécialement dans la famille des facteurs de transcription tel que les produits de gènes à homéodomaines.

Inactivation des gènes apparentés chez la souris

L'analyse précédente pose la question de savoir si les gènes Hox et HOM-C ont un rôle semblable dans le développement. La mise en oeuvre de technologies astucieuses permet de répondre à cette question. Les techniques qui permettent de mélanger différents types cellulaires dans des embryons de souris en culture et de réimplanter ces embryons dans des mères porteuses sont utilisées depuis près de 30 ans. Plus récemment, on a développé des techniques qui permettent de cultiver des précurseurs de lignées germinales de souris (**cellules embryonnaires initiales**, ou cellules ES) dans des conditions telles qu'elles puissent être injectées efficacement dans la masse cellulaire d'embryons hôtes et repeupler avec succès une lignée germinale de la souris chimère ainsi produite (Figure 25-28 et aussi page 477-480). De plus, on peut injecter à des cellules ES en culture des gènes altérés qui peuvent remplacer leur équivalent normal par recombinaison homologue grâce aux enzymes de réparation de l'ADN présent dans les cellules ES. Ainsi, les chercheurs peuvent maintenant accomplir l'**inactivation ciblée** de gènes spécifiques. Une colonie de cellules contenant un gène inactivé peut être injectée dans des embryons hôtes qui sont ensuite implantés dans des mères porteuses ayant des marqueurs génétiques (tel une couleur du pelage) qui les différencient des cellules hôtes aussi bien que des cellules ES. Les souris adultes en résultant, croisées en retour avec des contrôles appropriés, et les individus F1 portant les marqueurs des cellules ES sont donc hétérozygotes pour la mutation inactivante. Ces souris F1 sont alors croisées entre elles pour observer le phénotype des homozygotes inactivés dans la F2.

Application de la technique d'inactivation aux groupes de gènes Hox

Plusieurs gènes Hox ont à présent été inactivés et le résultat marquant est que les phénotypes des souris homozygotes pour la mutation d'inactivation présentent un profil parallèle à celui des mouches homozygotes pour des allèles nuls HOM-C. Ainsi l'inactivation de l'HOXC-8 provoque une transformation anatomique frappante : la formation de côtes sur la première vertèbre lombaire, L1, qui, normalement, est la première vertèbre sans côte après la cage thoracique (Figure 25-29). La vertèbre L1 est donc transformée de façon homéotique. Elle a maintenant l'identité segmentaire d'une vertèbre plus antérieur. Dans le jargon des généticiens, *Hox-c8*$^-$ a antériorisé sa destinée. Manifestement ce gène Hox semble contrôler le devenir segmentaire de manière très semblable aux gènes HOM-C, puisque, par exemple, l'absence du gène *Ubx* chez *Drosophila* provoque également une antériorisation.

Cette analyse génétique par inactivation nous aide aussi à comprendre comment les quatre groupes paralogues Hox déterminent l'identité segmentaire A/P chez les mammifères (Figure 25-30). Le

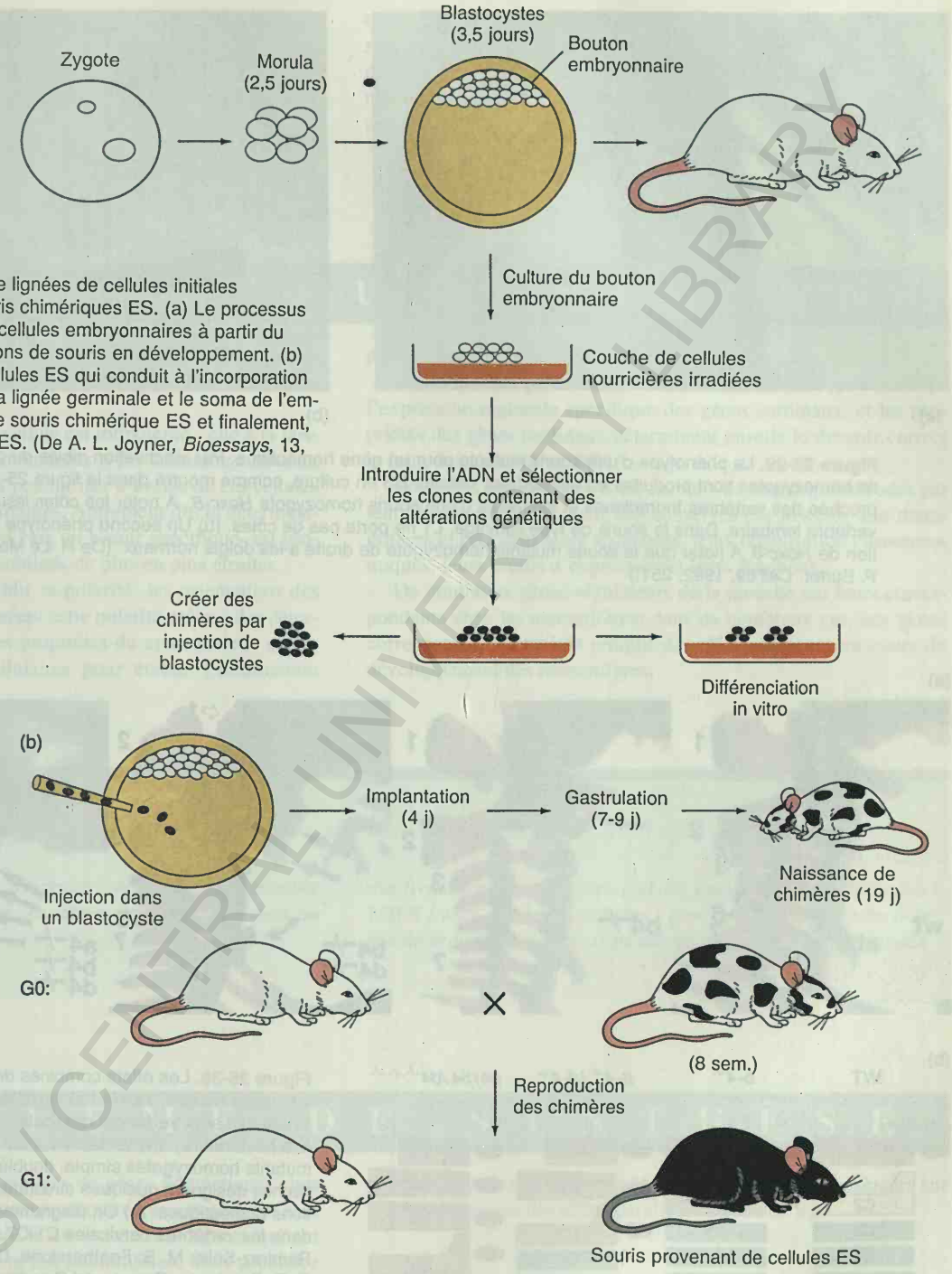


Figure 25-28. La production de lignées de cellules initiales embryonnaires (ES) et de souris chimériques ES. (a) Le processus d'établissement de lignées de cellules embryonnaires à partir du bouton embryonnaire d'embryons de souris en développement. (b) Le processus d'injection de cellules ES qui conduit à l'incorporation des cellules ES mutées dans la lignée germinale et le soma de l'embryon récepteur produisant une souris chimérique ES et finalement, une souris dérivée de cellules ES. (De A. L. Joyner, *Bioessays*, 13, 1991, 649.)

groupe 4 des gènes Hox - Hoxa-4, Hoxb-4, Hoxc-4 et Hoxd-4 - semble être constitué de gènes paralogues, c'est-à-dire, équivalents au sein de chacun des quatre groupes Hox. L'inactivation de *Hoxb-4* et *Hoxd-4* a été réalisée et affecte le développement de sept vertèbres cervicales. Chaque inactivation homozygote a un effet homéotique très faible, provoquant une légère transformation de la deuxième vertèbre cervicale (C2) en première (C1). L'inactivation de *Hoxa-4* a un effet encore plus faible et donne presque le phénotype sauvage. L'homozygote doublement inactivé pour *Hoxb-4* et *Hoxd-4* montre une altération phénotypique plus sévère, transformant complètement C2 et partiellement C3 en C1. De plus, C6 ressemble maintenant fortement à C5 et C7 à C6. Un homozygote triplement inactivé dans Hoxa-4, Hoxb-4 et Hoxd-4 est encore plus fortement affecté, avec C2 et C3 totalement, et C4 et C5 partiellement transformés en vertèbres phénotypiquement C1, alors que C6 et C7 prennent le type C5. Ainsi, l'effet cumulé de l'élimination

SCU IASI/ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

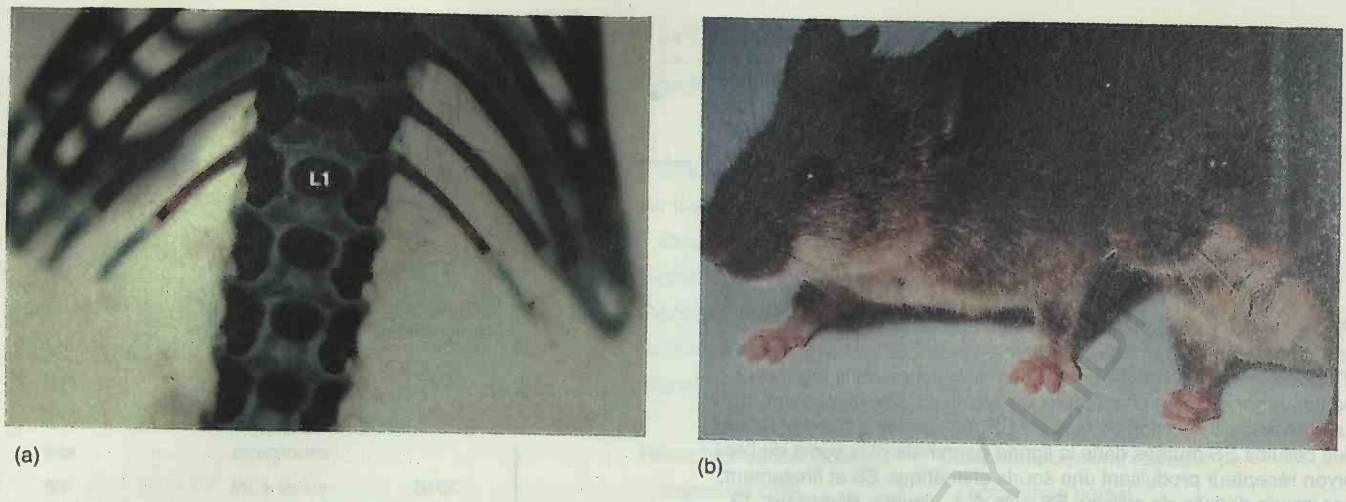


Figure 25-29. Le phénotype d'une souris mutante pour un gène homéotique. Par inactivation ciblée du gène *Hoxc-8*, des souris homozygotes sont produites en utilisant des cellules ES en culture, comme montré dans la figure 25-28. (a) Une vue rapprochée des vertèbres thoraciques et lombaires d'une souris homozygote *Hoxc-8*. A noter les côtes issues de L1, la première vertèbre lombaire. Dans la souris de type sauvage, L1 ne porte pas de côtes. (b) Un second phénotype inattendu de l'inactivation de *Hoxc-8*. A noter que la souris mutante homozygote de droite a les doigts normaux. (De H. Le Mouellic, Y. Lallemand et P. Burlet, *Cell* 69, 1992, 251.)

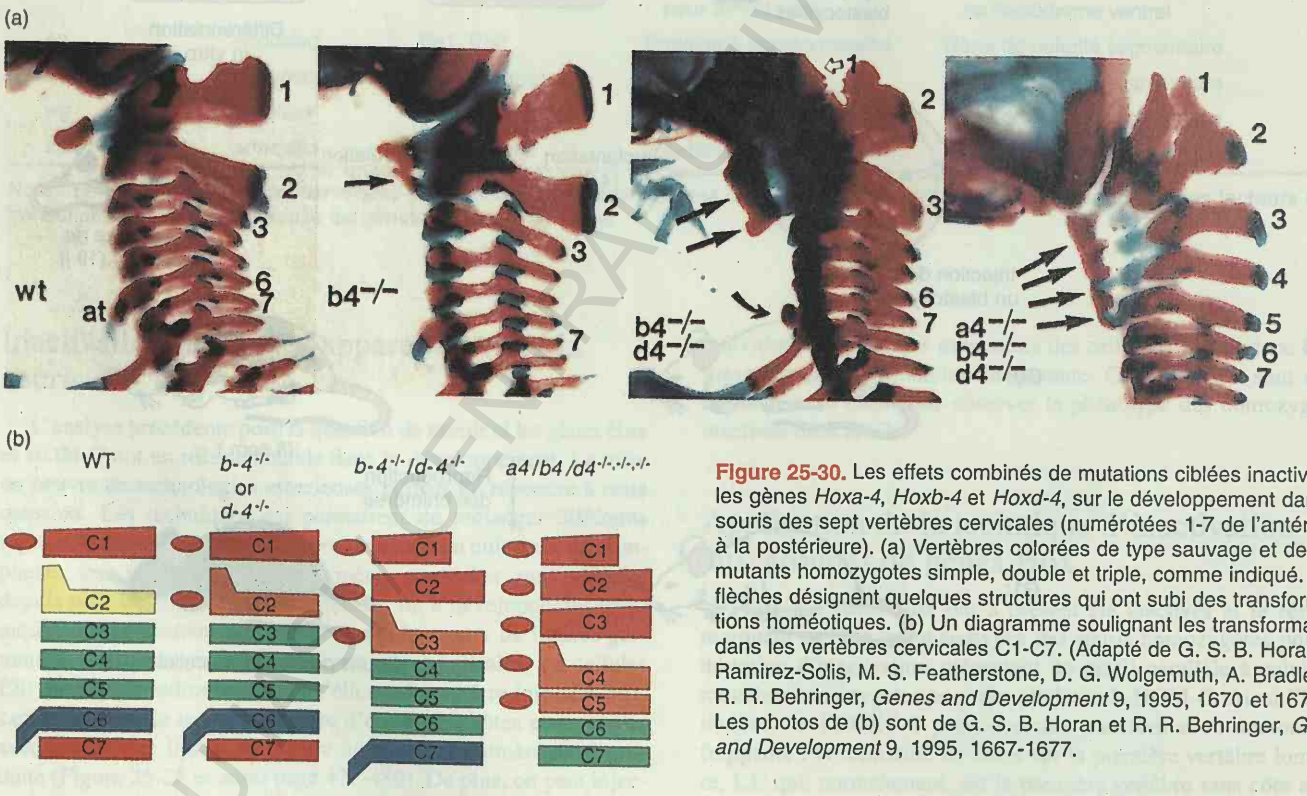


Figure 25-30. Les effets combinés de mutations ciblées inactivant les gènes *Hoxa-4*, *Hoxb-4* et *Hoxd-4*, sur le développement dans la souris des sept vertèbres cervicales (numérotées 1-7 de l'antérieure à la postérieure). (a) Vertèbres colorées de type sauvage et de mutants homozygotes simple, double et triple, comme indiqué. Les flèches désignent quelques structures qui ont subi des transformations homéotiques. (b) Un diagramme soulignant les transformations dans les vertèbres cervicales C1-C7. (Adapté de G. S. B. Horan,R. Ramirez-Solis, M. S. Featherstone, D. G. Wolgemuth, A. Bradley et R. R. Behringer, *Genes and Development* 9, 1995, 1670 et 1672. Les photos de (b) sont de G. S. B. Horan et R. R. Behringer, *Genes and Development* 9, 1995, 1667-1677.

des gènes paralogues de chacun des groupes Hox est plus important que l'inactivation d'un seul de ces gènes. Ceci suggère qu'il y a un certain degré de chevauchement ou une certaine redondance de fonction entre les gènes paralogues des quatre groupes, et qu'ils peuvent participer ensemble à la définition des divers segments du plan corporel des vertébrés.

Un dernier type d'expérience attestant du degré de conservation des divers gènes homéotiques est le remplacement de gènes hétérologues. Dans ces expériences la séquence codante d'un gène d'un groupe Hox de vertébré est introduite dans un mutant de *Drosophila* dont le génotype est dépourvu de la fonction supposée de l'homologue de ce gène de vertébré. Dans plusieurs cas, la protéine du vertébré peut remplacer la fonction manquante du gène de *Drosophila*. Ainsi, non seulement les séquences de ces protéines homéotiques sont-elles tout à fait conservées, et leurs modes d'expression totalement analogues, mais encore sont-elles capables

d'agir correctement pour contrôler l'identité segmentaire dans des organismes très distants sur le plan de l'évolution. Comme on dit familièrement, plus ça change, plus c'est la même chose!

Tout le travail réalisé jusqu'à présent suggère que les groupes Hox ont une grande parenté évolutive avec les gènes HOM-C, et que cette parenté se marque aussi sur le plan fonctionnel. Il en résulte un message fort, à savoir que les stratégies du développement animal sont très anciennes et fortement conservées, et qu'un mammifère et une mouche se construisent en utilisant des mécanismes de régulation très semblables.

RÉSUMÉ

Les détails du développement animal peuvent différer d'une espèce à l'autre. Mais les exemples que nous avons examinés illustrent des thèmes généraux.

Au début de la vie, chaque cellule est totipotente : elle a la possibilité de se différencier en de nombreux types cellulaires. Mais au cours des étapes ultérieures les possibilités d'avenir de ces cellules deviennent de plus en plus restreintes. Autrement dit, la détermination cellulaire -son engagement vers un avenir spécifique- est progressivement limitée à des possibilités de plus en plus étroites.

L'oeuf doit rapidement établir sa polarité -les orientations des axes corporels. Les mouches créent cette polarité grâce à des déterminants maternels utilisant des propriétés du cytosquelette et des systèmes de signaux intercellulaires pour établir l'information positionnelle.

L'information positionnelle est ensuite utilisée pour activer l'expression régionale spécifique des gènes cardinaux, et les propriétés des gènes cardinaux déterminent ensuite le devenir correct le long des axes A/P et D/V.

Les gènes homéotiques et les facteurs de transcription codés par leurs homéodomaines, sont très conservés des insectes aux mammifères et ceci dans leurs séquences, leurs organisation chromosomiques, leurs profils d'expression et leurs fonctions.

De nombreux gènes régulateurs de la mouche ont leurs correspondants chez les mammifères; dans de nombreux cas, ces gènes correspondants semblent remplir des rôles analogues au cours du développement des mammifères.

Diagramme conceptuel

Etablissez un diagramme conceptuel reliant le plus possible des termes suivant. Notez que ces termes sont présentes dans un ordre quelconque

inactivation ciblée de gènes / gènes homéotiques / totipotence / EGFR / axes A/P / microtubules / gène lacunaire / gènes de polarité de segments / gradients de morphogènes / gènes paralogues.

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Les études comparées des groupes de gènes homéotiques chez *Drosophila* et chez la souris nous ont montré que ces groupes sont des entités anciennes, précédant la divergence des lignées qui ont donnés naissance aux insectes et aux mammifères. Vous souhaitez savoir si d'autres gènes impliqués dans les voies de développement sont aussi fortement conservés pour leurs structures et leurs fonctions. Chez *Drosophila*, *wg (wingless)*, est un des gènes de polarité segmentaire.

a. Vous souhaitez identifier le gène équivalent à *wg* (c'est-à-dire homologue à *wg*) chez la souris. En utilisant les techniques de l'ADN recombinant décrites précédemment, concevez des expériences pour cloner l'ADN correspondant à l'homologue de *wg* chez la souris (ce que nous appellerons *mwg* pour souris sans ailes!).

b. Imaginez que vous ayez réussi à cloner un ADN complémentaire (ADNc) correspondant à *mwg*. Décrivez un protocole permettant de caractériser ce gène et de déterminer s'il exercera sur le développement des effets parallèles à ceux de *wg*.

Solutions

a. Une leçon de l'analyse des groupes de gènes homéotiques est que certaines parties de leur région codante, les homéodomaines, sont très conservées par rapport aux autres régions de ces gènes. Ainsi, s'il y a un homologue *wg* de souris (un gène provenant probablement d'un ancêtre commun) la séquence d'ADN de l'homologue a une plus grande probabilité d'être conservée dans certaines voire toutes ses régions codantes plutôt que dans les régions non transcrites ou les introns. Pour cette raison, il est préférable d'utiliser un ADNc *wg* pour tenter d'identifier les clones correspondant à *mwg*, parce que l'ADNc contient les régions du gène codant pour la protéine à l'exclusion des régions non transcrites et des introns. Utilisant une approche classique, on peut marquer radioactivement et dénaturer l'ADNc *wg* et l'utiliser comme

COLLEGE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sonde. Il faut ensuite hybrider la sonde sur un filtre de nitrocellulose portant l'ADN fixé provenant d'une librairie génomique de fragments d'ADN de souris clonés dans des phages vecteurs. Le gène de souris, s'il existe, montrera certainement de nombreuses différences par rapport aux séquences d'ADN du gène de la mouche. Ainsi, même si *mwg* et *wg* codent pour le même acide aminé en un site bien précis, le code génétique étant dégénéré, l'acide aminé peut être codé par un codon différent, la différence portant habituellement sur la troisième position du codon. Pour compenser de telles différences, ce type d'hybridation interspécifique est réalisée en conditions de « faible sensibilité »; en d'autres termes, les conditions d'hybridation sont adaptées de façon à ce que l'hybridation puisse se faire même s'il y a quelques défauts dans les appariements de bases.

Ensuite, si le filtre hybridé est placé sur un film sensible aux rayons X, chaque plaque de phages contenant le gène *mwg* montrera une tache noire. Il faudra ensuite retourner à la plaque de bactériophages correspondant à ce filtre, prélever le phage de l'endroit correspondant à la tache noire, et retester le phage par hybridation pour s'assurer du bon choix du phage. Il s'agira ensuite de purifier un fragment de restriction du gène supposé *mwg* qui s'hybride par Southern avec une sonde *wg* et d'utiliser ce fragment *mwg* comme sonde pour identifier l'ADNc de souris contenant les séquences correspondantes au fragment génomique *mwg*. Ayant obtenu l'ADNc de *mwg*, il est alors souhaitable de la séquencer pour déterminer s'il possède un cadre de lecture ouvert (c'est-à-dire, une région codant pour une protéine) semblable à la séquence d'acides aminés de *wg*. Si c'est le cas, vous avez isolé un homologue *mwg* potentiel.

b. Une fois ce gène *mwg* isolé, il peut être caractérisé de plusieurs façons. Tout d'abord, on déterminera où et quand il est exprimé au cours du développement. Une manière de faire est par transfert de Northern, dans lequel on utilise l'ADNc *mwg* dénaturé radioactif pour l'hybrider sur un filtre contenant les ARN et provenant de différents stades de développement ou tissus de la souris et séparés par électrophorèse. Une autre manière de faire est par hybridation d'ARN *in situ*, utilisant une sonde *mwg* pour hybrider les transcrits dans des sections histologiques de souris. Une troisième manière consiste à fabriquer des anticorps contre la protéine recombinante *mwg* et à utiliser ces anticorps comme sondes dans des tests immunohistochimiques.

Sachant où et quand le gène est exprimé, on peut avoir quelqu'idée sur sa signification fonctionnelle, idée que l'on souhaitera tester. La meilleure façon est de provoquer une inactivation ciblée chez la souris. Pour cela, il faut en premier lieu construire un gène *mwg* altéré contenant de l'ADN sans signification. Par transformation de cellules ES en culture, on peut sélectionner des remplacements de gène homologue inactivant effectivement une des copies de *mw g* dans la cellule. Il faut ensuite transplanter le clone des cellules ES contenant le *mwg* inactivé dans des embryons de souris récepteurs, réimplanter les embryons dans une mère hôte nourricière, récupérer les adultes mosaïques en résultant, et tester leur lignée germinale pour la transmission de l'homologue *mwg* inactivé en sondant l'ADN des individus F1 pour répérer la séquence non-sens utilisée pour l'inactivation. Après deux générations de croisement des individus F1, on devrait avoir produit des souris homozygotes pour le gène *mwg* inactivé. Il faudra alors déterminer les phénotypes de ces individus et tenter de mettre en relation les phénotypes avec les voies d'expression du gène et avec les prévisions que l'on peut faire à partir du rôle de l'homologue *wg* dans les mouches.

Ce scénario a maintenant été utilisé de nombreuses fois et s'est révélé une voie d'approche très profitable à l'analyse du développement chez les mammifères.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Lors de l'embryogenèse chez les mammifères, le bouton embryonnaire (ou futur foetus) se sépare rapidement des cellules qui joueront le rôle de membranes, de conduits respiratoires, nutritifs et excréteurs entre mère et foetus.

a. Imaginez des expériences utilisant des souris mosaïques pour déterminer quand cette divergence est acquise.

b. Comment peut-on suivre la formation des diverses membranes foetales ?

Solutions

a. Il faut posséder des marqueurs permettant de distinguer différentes lignées cellulaires. Ceci peut se faire en utilisant des souches de souris se différenciant par des marqueurs chromosomiques et biochimiques (Une autre façon de faire serait d'utiliser les différences entre les chromosomes sexuels des cellules XX et XY ou en induisant une perte de chromosome ou des aberrations par inactivation des embryons).

Ayant décidé de la différence de marqueur a utiliser, une façon de répondre à la question est d'injecter une cellule d'une souche dans les embryons de l'autre à différentes étapes du développement. Une autre approche encore est de fusionner des embryons des deux souches contenant un nombre défini de cellules. Dans chaque cas, on étudiera les embryons au stade où le bouton embryonnaire et les membranes sont distincts et reconnaissables. Lorsque l'insertion de cellules ou la fusion se traduisent par des membranes et un bouton comportant exclusivement un seul type de cellule et jamais une mosaïque, les deux chemins de développement ont déjà divergés.

b. On réalise les mêmes expériences d'injection ou de fusion avec des embryons précoces. On examine l'aspect de la mosaïque. On tentera de corréler la présence de cellules de génotypes sem-

blables dans différentes membranes. Il devrait être possible de déterminer la filiation des cellules dans chaque type de membrane.

2. Le criblage de mutants létaux dû à des effets maternels chez *Drosophila* exige que les filles homozygotes, mutantes provenant de parents hétérozygotes, survivent jusqu'au stade adulte car ce sont ces descendants qui seront testés pour la production d'un progéniture non viable. Cependant, il est possible que des gènes qui fournissent d'importants produits maternels pour la formation des axes A/P et D/V, soient aussi responsables d'autres fonctions importantes dans certains types cellulaires plus tard au cours du développement, de sorte que les mutants nuls de ces gènes seraient homozygotes létaux. Comment peut-on contourner la létalité homozygote pour tester les contributions d'un gène à la formation des axes A/P et D/V maternels ?

SUGGESTIONS: (1) Il faut se souvenir des phénotypes de souris qui ont bénéficié d'une transplantation de cellules ES; (2) les lignées germinales et somatiques de la mouche se séparent très tôt au cours du développement.

Solution

La clé de ce problème réside dans la production d'une lignée germinale mosaïque individuelle. Si les cellules précurseurs femelles de lignée germinale de génotype homozygote mutant sont viables et peuvent former des ovocytes, et si les cellules de ce génotype peuvent être placées dans une femelle de type somatique sauvage, on peut alors tester cette mosaïque pour sa capacité à produire une descendance avec des défauts dans A/P ou D/V.

Une telle mosaïque peut être créée par transplantation des précurseurs de lignée germinale, les cellules polaires, par des techniques analogues à la transplantation de cellules ES. Par exemple, on peut enlever des cellules polaires d'un embryon donneur au stade blastoderme, provenant d'un souche hétérozygote pour la mutation récessive létale. Ces cellules seront transplantées dans des embryons récepteurs différemment marqués. (Il faut être attentif à ne transplanter des cellules polaires ne provenant que d'un seul embryon donneur dans chaque récepteur). Un quart des embryons donneurs seront homozygotes pour la mutation létale récessive, et la moitié de ceux-ci seront femelles. Pour les embryons récepteurs, la moitié seront femelles. Il en résulte que pour que la transplantation réussisse, les cellules polaires et le récepteur doivent être de même sexe. On peut donc s'attendre à ce qu'un seizième des transplants soient potentiellement un succès. Les autres seront soit sexuellement incompatibles (la moitié des embryons injectés) et ne donneront pas de descendance, soit proviendront de cellules polaires portant au moins un allèle sauvage du gène en question. Parmi ceux-ci on recherchera les cas où l'on obtient des embryons descendants ayant des défauts dans A/P ou D/V.

Ces expériences de lignées germinale en mosaïque ont été très utiles pour identifier les gènes agissant chez la mère qui n'auraient pas pu être obtenu par criblage standard de mutants. Des astuces génétiques additionnelles sont utilisées pour éliminer les cellules des lignées germinales du récepteur et permettre de marquer le chromosome mutant récessif dans l'embryon de sorte que le génotype des cellules germinales donatrices puisse être reconnu sans ambiguïté.

P R O B L È M E S

1. Dans son livre « In His Image : The Cloning of a Man », David Rorvik dit qu'un bébé a été cloné à partir de cellules d'un homme assez âgé. Peu (si tant est qu'il y en eut) de généticiens ont cru cette histoire, mais beaucoup de scientifiques croient que le clonage humain est une possibilité pour le futur, puisque des clones humains (les vrais jumeaux) existent naturellement. En quoi la possibilité de produire des clones humains en laboratoire pourrait-elle être utile pour déterminer l'importance relative de l'hérédité et de l'environnement dans la détermination du phénotype final d'un individu humain ?

2. Pour certains gènes Hox de mammifères on a pu montrer qu'ils sont plus semblables à l'un des gènes HOM-C d'insecte qu'à d'autres. Présenter une approche expérimentale utilisant les moyens de la biologie moléculaire et qui permette d'arriver à de telles conclusions.

3. a. Lorsque l'on enlève les 20 pour-cent antérieur du cytoplasme d'un embryon de *Drosophila* nouvellement formé, on peut provoquer un phénotype bicaudal, dans lequel il y a une duplication en miroir des segments abdominaux. En d'autres termes, de l'extrémité antérieure de l'embryon à la postérieure, l'ordre des segments est A8-A7-A6-A5-A4-A4-A5-A6-A7-A8. Peut-on expliquer ce phénotype en terme d'action des déterminants antérieurs et postérieurs et comment ils affectent l'expression des gènes lacunaires ?

b. Les femelles homozygotes pour la mutation *oskar* (*osk*) produisent des embryons dépourvus de segments abdominaux et dans lesquels les segments céphaliques et thoraciques sont plus volumineux. En fonction de l'activité des déterminants antérieurs et postérieurs et de l'action des gènes lacunaires peut-on expliquer comment *oskar* produit ce phénotype mutant ? Dans votre réponse, expliquez pourquoi il y a perte de segments plutôt que duplication en miroir des segments antérieurs.

4. Les trois protéines à homéodomaines *Abd-B, abd-A* et *Ubx* sont codées par des gènes du groupe BX-C de *Drosophila.* Dans les embryons de type sauvage, le gène *Abd*-B est exprimé dans les segments abdominaux postérieurs, *abd-A* dans les segments abdominaux médians et *Ubx* dans les segments abdominaux antérieurs et thoraciques postérieurs. Lorsque le gène *Abd-B* est délété, *abd-A* est exprimé à la fois dans les segments abdominaux médians et postérieurs. Lorsque le gène *abd-A* est délété, *Ubx* est exprimé dans les segments thoraciques postérieurs et abdominaux antérieurs et médians. Si *Ubx* est délété, les voies d'expression d'*abd-A et Abd-B* sont inchangées par rapport au type sauvage. Lorsque *abd-A* et *Abd-B* sont éliminés, *Ubx* est exprimé dans tous les seg-

ments, du thorax postérieur à l'extrémité postérieure de l'embryon. Peut-on expliquer ces observations, prenant en considération que les gènes lacunaires contrôlent l'expression initiale des gènes homéotiques ?

5. Lorsqu'un embryon est un mutant homozygote pour le gène lacunaire *Kr*, les quatrième et cinquième sillons des gènes de la règle d'appariement *ftz* (à partir de l'extrémité antérieure), ne sont pas formés normalement. Lorsque le gène lacunaire *kni* est muté, les cinquième et sixième sillons ne sont pas formés normalement. Comment explique-t-on ces résultats en terme d'établissement du nombre de segments dans l'embryon ?

6. En discutant de la formation des axes A/P et D/V chez *Drosophila*, nous avons noté que pour des mutations telles que *bcd*, les mères homozygotes produisent une descendance de mutants présentant uniformément des défauts de segmentation. Ceci reste vrai que la descendance soit elle-même $bcd^{+}bcd$ ou *bcd bcd*. Quelques autres mutations à effet maternel létal sont différentes en ceci que le phénotype mutant peut être « secouru » par l'introduction du gène sauvage provenant du père. En d'autres termes, pour de telles mutations à effet maternel létales « réparables », les animaux mut^{+} *mut* sont normaux mais les individus *mut mut* sont mutants. Expliquez la différence entre des mutations létales à effets maternels réparables ou non réparables.

7. Le déterminant antérieur de l'oeuf de *Drosophila* est *bcd*. Une mère hétérozygote avec une délétion dans *bcd* n'a qu'une copie du gène *bcd*. En utilisant les éléments P pour insérer dans le génome, par transformation, des copies du gène *bcd* cloné, il est possible de produire des mères ayant des copies supplémentaires du gène.

Rapidement après la formation du blastoderme l'embryon de *Drosophila* développe une dentelure qui est plus ou moins perpendiculaire à l'axe longitudinal du corps, le sillon *céphalique*. Dans la descendance d'individus monosomiques *bcd*, ce sillon est très proche de l'extrémité antérieure, à 1/6 de la distance qui sépare les extrémités antérieure et postérieure. Dans la descendance des diploïdes sauvages standard (disomiques pour bcd^{+}), le sillon céphalique apparaît plus postérieur, à 1/5 de la distance entre les extrémités antérieure et postérieure de l'embryon. Dans la progéniture de trisomiques *bcd*, il est encore plus postérieur. Si la dose de gènes est accrue, il se déplace de plus en plus postérieurement, jusqu'à atteindre le milieu de l'embryon dans les hexasomiques.

a. Expliquer l'effet de dose de gènes *bcd* sur la formation de sillon céphalique en fonction de la contribution de *bcd* à l'établissement de l'axe A/P.

b. Représenter les schémas d'expression relatifs des ARNm des gènes lacunaires *Kr* et *kni* dans le blastoderme d'embryons provenant de mères monosomiques, trisomiques et hexasomiques pour *bcd*.

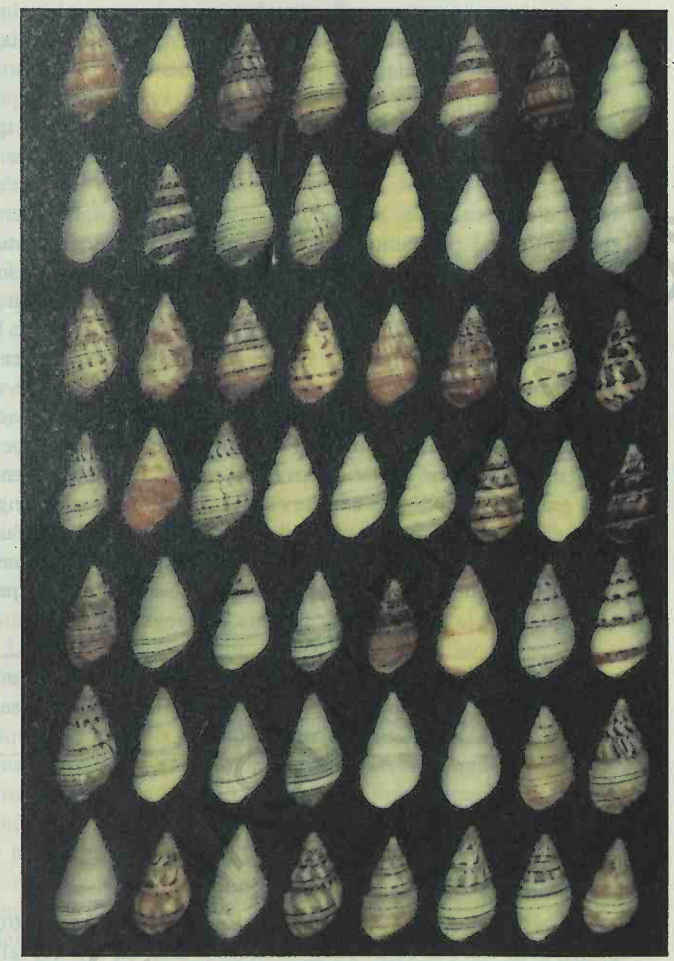
8. Dans l' embryon de *Drosophila*, les régions 3' non traduites (abréviée 3'UT) des ARNm [les régions situées entre les codons de terminaison de traduction et les queues poly(A)] sont responsables de la localisation aux pôles antérieurs pour *bcd* et postérieur pour *nos*. Des expériences ont été réalisées dans lesquelles les 3'UT de *bcd* et *nos* ont été échangées. Supposons que l'on construise des éléments transposables P produisant soit de l'ARNm *nos* avec les 3'UT de *bcd* soit de l'ARNm *bcd* avec le 3'UT de *nos* afin de les utiliser pour transformer l'embryon de *Drosophila*. On construit aussi une femelle qui est un mutant homozygote pour *bcd* et *nos*, et l'on y transfère les deux constructions par transformation. A quel phénotype peut-on s'attendre pour ces embryons en termes de développement de l'axe A/P ?

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

26

Génétique des populations



Polymorphisme de la couleur des coquilles de *Liguus fascitus* (Selon David Hillis, *Journal of Heredity*, Juillet - Août 1991)

CONCEPTS-CLÉS

- La génétique des populations a pour dessein de comprendre la constitution génétique d'une population ainsi que les facteurs qui la déterminent et la modifient.
- Chez toutes les espèces, une grande part de la variation génétique, au sein des populations aussi bien qu'entre elles, provient de l'existence de plusieurs allèles pour des loci différents.
- Une variable fondamentale en génétique des populations est la fréquence à laquelle sont présents les allèles d'un locus donné.
- La fréquence d'un allèle donné dans une population peut être modifiée par mutation, sélection, ou migration, ou encore par les effets de l'échantillonnage au hasard.
- Dans le cas idéal où aucun facteur de changement ne s'exercerait, une population panmictique se caractériserait par des fréquences génotypiques constantes pour un locus donné.

BIOLOGY UNIVERSITY LIBRARY

Les études de Mendel sur l'hérédité — et en fait toute l'importance attribuée à l'hérédité au cours du dix-neuvième siècle — trouvent leurs sources dans deux problèmes étroitement liés : comment améliorer les plantes cultivées et comment comprendre la nature et l'origine des espèces. Le point commun à ces problèmes (et qui les différencie des problèmes de génétique de transmission et d'action des gènes) réside dans le fait que ce sont des populations qui s'y trouvent concernées plutôt que des individus. Toutes les études portant sur la réplication, la synthèse protéique, le développement et la mécanique chromosomique concernent des processus qui se déroulent au sein des cellules d'un organisme, alors que la transformation d'une espèce, que ce soit au cours du processus naturel de l'évolution ou par l'intervention délibérée de l'homme, représente une modification dans les propriétés d'un ensemble d'individus - soit l'entièreté d'une population soit un ensemble de populations.

Message La génétique des populations étudie la relation entre les changements héréditaires des populations et les processus individuels d'hérédité et de développement.

La révolution de Darwin

Les théories modernes de l'évolution s'identifient si complètement avec le nom de Charles Darwin (1809-1882) que de nombreuses personnes pensent que le concept même d'évolution organique fut tout d'abord présenté par Darwin, alors que ce n'est pas le cas. Bien avant la publication en 1859 de l'*Origine des Espèces* par Darwin, la plupart des savants avaient abandonné la notion d'espèces fixées, demeurées inchangées depuis leur origine lors d'une grandiose création de la vie. A cette époque, la plupart des biologistes s'accordaient à penser que les nouvelles espèces devaient être issues d'espèces plus anciennes par l'un ou l'autre processus d'évolution; le problème cependant était d'expliquer *comment* se déroulait cette évolution.

La théorie de Darwin des mécanismes de l'évolution se fonde sur l'existence de la variation chez les individus d'une espèce. Les individus appartenant à une génération sont qualitativement différents les uns des autres. L'évolution de l'espèce dans son ensemble résulte des taux différentiels de survie et de reproduction des individus, de telle sorte que les fréquences relatives des différents types se modifient au cours du temps. De ce point de vue, l'évolution se présente comme un processus de tri. Pour Darwin, l'évolution du groupe provient des différences de survie et de reproduction caractérisant des variants *déjà présents* dans le groupe - variants qui sont apparus indépendamment de l'environnement dans lequel vit le groupe.

Message Darwin proposa une nouvelle explication pour rendre compte du phénomène déjà reconnu d'évolution. Il défendit l'idée que la population d'une espèce donnée comporte à un moment donné des individus différant par divers caractères. La population de la génération suivante contiendra à une fréquence plus élevée les types qui survivent et se reproduisent avec le plus de succès dans les conditions de milieu existantes. De ce fait, les fréquences des différents types présents dans l'espèce se modifieront au cours du temps.

Une évidente similitude existe entre le processus d'évolution tel que décrit par Darwin et celui par lequel le sélectionneur ou l'éleveur améliore une plante cultivée ou un animal domestique. Le sélectionneur choisit les plantes au plus haut rendement dans la population existante et (autant que possible) les utilise comme parents de la génération suivante. Si les traits responsables du rendement élevé sont héréditaires, la génération suivante produira aussi des plantes à haut rendement. Ce n'est pas par hasard que Darwin choisit le terme de **sélection naturelle** pour décrire son modèle d'évolution dû aux différences de taux de reproduction des variants présents dans la population. Il avait présent à l'esprit, comme modèle d'évolution, la sélection exercée par les éleveurs sur des générations successives de plantes et d'animaux domestiques.

Nous pouvons résumer la théorie de Darwin de l'évolution par sélection naturelle en trois principes :

1. **Le principe de variation.** Parmi les individus de toute population, existe une variation concernant aussi bien la morphologie, la physiologie que le comportement.

2. **Le principe d'hérédité.** Une descendance ressemble davantage à ses parents qu'à des individus non apparentés.

3. **Le principe de sélection.** Certains types réussissent mieux que d'autres à survivre et à se reproduire dans un milieu donné.

En d'autres termes, la sélection ne peut aboutir à modifier la structure d'une population que si celle-ci présente une variation sur laquelle la sélection peut s'exercer. Si tous les individus sont identiques, aucune différence dans la capacité de reproduction ne peut influencer la structure de la population qui les contient. En outre, pour que les différences de reproduction puissent altérer la composition génétique de la population, la variation doit être, du moins partiellement, transmissible. Si des animaux de grande taille produisent au sein de la population plus de descendants que ceux de petite taille mais que leur descendance n'est pas en moyenne plus grande que celle des animaux de petite taille, aucun changement de la structure de la population ne peut se produire d'une génération à l'autre. Finalement, si tous les types variants donnent lieu, en moyenne, au même nombre de descendants, on peut escompter que la population demeurera inchangée.

Message Les principes darwiniens de variation, d'hérédité et de sélection doivent être d'application pour que se produise une évolution fondée sur la variation.

La variation et sa modulation

La génétique des populations s'efforce de traduire les trois principes de Darwin en termes génétiques précis. En tant que telle, elle s'efforce de décrire la variation génétique dans les populations et de déterminer expérimentalement et théoriquement comme cette variation évolue dans le temps et dans l'espace.

Message La génétique des populations est l'étude de la variation génétique et de sa modulation dans le temps et dans l'espace.

Exemples de variation

La génétique des populations traite nécessairement de la variation génotypique, mais, par définition, seule la variation phénotypique peut être observée. La relation entre phénotype et génotype varie en complexité d'un caractère à l'autre. A l'un des extrêmes, le phénotype peut être représenté par la séquence d'ADN d'un fragment de génome. Dans ce cas, la distinction entre génotype et phénotype s'estompe et nous pourrions dire, en fait, que nous observons directement le génotype. A l'autre extrême se situent l'ensemble des caractères intéressant particulièrement les sélectionneurs et la plupart des spécialistes de l'évolution - les variations de rendement, de taux de croissance, de forme, de métabolisme et de comportement, qui constituent les différences marquantes entre variétés et espèces. Ces caractères sont complexes à définir génotypiquement et nous devons faire usage des méthodes introduites au chapitre 27 pour pouvoir dire quelque chose de leurs génotypes. Mais, comme nous le verrons au chapitre 27, il n'est pas possible d'établir des règles très précises en ce qui concerne la variation génotypique sous-tendant les caractères quantitatifs. Pour cette raison, la plupart des études expérimentales en génétique des populations se sont bornées à des caractères dont les relations avec le génotype sont simples, comme les caractères étudiés par Mendel. Un des objets d'étude favoris des généticiens de populations humaines fut celui des différents types de groupes sanguins. Les différents phénotypes d'un groupe sanguin donné - disons le groupe MN - sont codés par des allèles d'un seul locus, et ces phénotypes sont insensibles aux variations du milieu.

L'étude de la variation comporte dès lors deux phases. La première consiste à décrire la variation phénotypique. La seconde en est la traduction en termes génétiques, une re-description génétique de la variation, en quelque sorte. Si une correspondance parfaite existe entre génotype et phénotype, ces deux étapes n'en constituent plus qu'une, comme dans le cas du groupe sanguin MN. Si la relation est plus complexe - comme, par exemple, à la suite d'un phénomène de dominance, qui fait que les hétérozygotes ressemblent aux homozygotes - il peut être nécessaire de réaliser des croisements expérimentaux ou d'observer des pedigrees pour pouvoir transposer les phénotypes en génotypes. C'est le cas pour le groupe sanguin ABO chez l'homme (voir page 93).

La façon la plus simple de décrire la variation mendélienne consiste à donner la distribution des fréquences des génotypes dans la population. Le tableau 26-1 présente la distribution des fréquences de trois génotypes au locus du groupe sanguin MN dans plusieurs populations humaines. Notez que la variation existe aussi bien au sein des populations qu'entre elles. Plus généralement, au lieu des fréquences des génotypes diploïdes, on utilise les fréquences des allèles distincts. Si f_{AA}, f_{Aa}, et f_{aa} sont les proportions des trois génotypes pour un locus où peuvent exister deux allèles, les fréquences $p(A)$ et $q(a)$ de ces allèles s'obtiennent en comptant leur nombre. Puisque chaque homozygote *AA* ne comporte que des allèles *A* et que seule la moitié des allèles de chaque hétérozygote *Aa* est du type *A*, la fréquence totale (p) des allèles A dans la population est

$$p = f_{AA} + 1/2\, f_{Aa} = \text{fréquence de } A$$

De même, la fréquence (q) des allèles *a* est donnée par

Tableau 26-1. Fréquences des génotypes pour des allèles au locus du groupe sanguin MN dans diverses populations humaines.

	Génotype			Fréquence allélique	
Population	*MM*	*MN*	*NN*	*p(M)*	*q(N)*
Esquimau	0,835	0,156	0,009	0,913	0,087
Aborigène australien	0,024	0,304	0,672	0,176	0,824
Egyptien	0,278	0,489	0,233	0,523	0,477
Allemand	0,297	0,507	0,196	0,550	0,450
Chinois	0,332	0,486	0,182	0,575	0,425
Nigérien	0,301	0,495	0,204	0,548	0,452

Source : W. C. Boyd, *Genetics and the Races of Man.* D. C. Heath, 1950

$$q = f_{aa} + 1/2\, f_{Aa} = \text{fréquence de } a$$

$$p + q = f_{AA} + f_{aa} + f_{Aa} = 1$$

Donc

$$q = 1 - p$$

Si des allèles multiples sont en cause, la fréquence de chacun des allèles est donnée par la fréquence de son homozygote plus la moitié de la somme des fréquences de tous les hétérozygotes auxquels il participe. Le tableau 26-1 donne les valeurs de p et q pour chacune des populations de groupe sanguin MN.

p représente la **fréquence génique** ou **fréquence allélique**, ou **fréquence gamétique.** Nous pouvons élargir sa portée en exprimant la variation qui se produit simultanément à plusieurs loci sous forme de **fréquences gamétiques,** ou fréquences **d'haplotypes** .

Chez l'homme le locus S (locus du facteur de sécrétion, déterminant si les protéines M et N sont aussi présentes dans la salive) est étroitement lié au locus MN. Le tableau 26-2 donne les fréquences (symbolisées par gs) des quatre haplotypes (*MS*, *Ms*, *NS*, et *Ns*) dans diverses populations. La fréquence des haplotypes s'obtient en additionnant les contributions des différents hétérozygotes et homozygotes à l'ensemble des gamètes. Par exemple, la fréquence de l'haplotype *MS* , symbolisée par *g(MS)* est donnée par

g(MS) = fréquence de *MS/MS* +
1/2 fréquence de *MS/NS* + 1/2 fréquence de *MS/Ms*
+ 1/2 fréquence de *MS/Ns*

Notez que le dernier terme de la somme concerne la fréquence du double hétérozygote *MS/Ns*. L'autre double hétérozygote *Ms/NS* n'intervient pas puisqu'il ne produit pas de gamète *MS*. Si une recombinaison avait lieu, l'hétérozygote *Ms/NS* pourrait produire des gamètes *MS* à un taux proportionnel à la fréquence de recom-

Tableau 26-2. Fréquences des types gamétiques pour le système MNS chez diverses populations humaines.

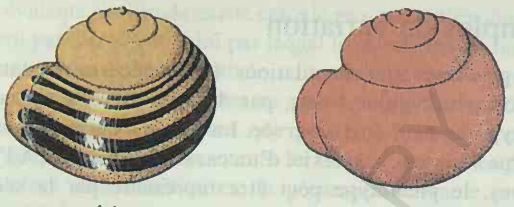
Population	Type gamétique				Hétérozygotie (*H*)	
	MS	*Ms*	*NS*	*Ns*	A partir de gamètes	A partir d'allèles
Ainu	0,024	0,381	0,247	0,348	0,672	0,438
Ougandais	0,134	0,357	0,071	0,438	0,658	0,412
Pakistanais	0,177	0,405	0,127	0,291	0,704	0,455
Anglais	0,247	0,283	0,080	0,390	0,700	0,469
Navajo	0,185	0,702	0,062	0,051	0,467	0,286

Source : A. E. Mourant, *The Distribution of the Human Blood Groups*, Blackwell Scientific Pub., 1954.

binaison. Il en ressort que pour donner les fréquences gamétiques d'une population, nous devons être capables de distinguer les doubles hétérozygotes en couplage de ceux qui sont en répulsion et de connaître la fréquence de recombinaison entre les gènes. Dans le système *MNS*, il n'y a pratiquement pas de recombinaison et les différents types d'hétérozygotes peuvent se reconnaître par analyse de pedigree.

Une *mesure* de la variation génétique (à opposer à sa *description* par les fréquences de gènes) est donnée par le taux **d'hétérozygotie** à un locus donné dans une population, qui correspond à la fréquence totale des hétérozygotes pour ce locus. Si l'un des allèles est représenté à une fréquence élevée et tous les autres à des fréquences proches de zéro, il y aura très peu d'hétérozygotie puisque, nécessairement, la plupart des individus seront homozygotes pour l'allèle le plus répandu. Nous nous attendons à une hétérozygotie élevée s'il y a de nombreux allèles d'un locus, tous à la même fréquence. Dans le tableau 26-1, l'hétérozygotie est simplement égale à la fréquence du génotype MN dans chacune des populations. Si l'on considère plus d'un locus à la fois, il y a deux façons possibles de calculer l'hétérozygotie. L'une est de faire la moyenne de la fréquence des hétérozygotes à chaque locus. L'autre consiste à prendre les fréquences gamétiques, comme au tableau 26-2, et à calculer la proportion des individus porteurs de deux formes gamétiques différentes. Ainsi, un individu *MS*/*Ms* est un hétérozygote même s'il ne l'est que pour un des deux loci. Ces deux méthodes ne débouchent pas en général sur la même valeur d'hétérozygotie. La valeur basée sur les fréquences des gamètes est toujours plus élevée puisque tout individu est considéré comme hétérozygote s'il l'est pour l'un des loci, même si l'autre est homozygote. Les résultats obtenus par ces deux modes de calcul sont présentés au tableau 26-2 (Voyez la discussion au sujet de l'équilibre d'Hardy-Weinberg à la page 790 pour le calcul de l'hétérozygotie).

De simples variations de type mendélien peuvent être observées au sein de populations de toutes espèces et entre elles, à tous niveaux phénotypiques, depuis les caractères morphologiques externes jusqu'à la séquence en acides aminés d'enzymes et d'autres protéines. En effet, grâce aux nouvelles méthodes de séquençage de l'ADN, des variations de séquence (comme les



(a) (b)

Figure 26-1. Aspects caractéristiques de la coquille de l'escargot *Cepaea nemoralis*. (a) jaune avec stries. (b) rose sans stries.

variants de nucléotides en troisième position dans des codons qui ne se différencient pas au niveau des acides aminés et même des variations des séquences non-codantes) ont été décelées. Chaque espèce ou organisme examiné jusqu'à présent révèle une variation génétique considérable, un **polymorphisme**, qui s'exprime à l'un ou l'autre niveau de phénotype, au sein d'une population ou d'une population à l'autre ou encore dans les deux à la fois. Un gène ou un caractère phénotypique est dit *polymorphe* si plus d'une forme de ce gène ou de ce caractère est présente dans la population. La variation génétique qui pourrait être la base de tout changement évolutif est omniprésente. La tâche du généticien est de décrire quantitativement cette variation, d'en déduire des prédictions concernant l'évolution des populations étudiées et de développer une théorie des changements évolutifs.

Il est impossible dans ce traité de fournir une image exacte de l'immense richesse de la variabilité génétique existant au niveau des espèces. Nous ne considérerons que quelques exemples des différents types de variation mendélienne qui doivent nous permettre, même superficiellement, de nous rendre compte de la diversité génétique au sein des espèces. Chacun de ces exemples pourrait être multiplié à l'infini chez d'autres espèces et pour d'autres caractères.

Variation morphologique. La coquille de l'escargot *Cepaea nemoralis* peut être rose ou jaune, selon que l'un ou l'autre des deux allèles d'un locus unique est présent, le rose dominant le jaune. La coquille peut être aussi striée ou non-striée (figure 26-1) suite à la ségrégation d'un deuxième locus lié au premier, l'allèle non-strié dominant l'allèle strié. Le tableau 26-3 montre la variation de ces deux loci dans plusieurs colonies de cet escargot en Europe. Les

Tableau 26-3. Fréquences des escargots (*Cepaea nemoralis*) à différentes couleurs de coquilles et à différents types de stries dans trois populations françaises.

Population	Jaune		Rose	
	Avec stries	Sans stries	Avec stries	Sans stries
Guyancourt	0,440	0,040	0,337	0,183
Lonchez	0,196	0,145	0,564	0,095
Peyresourde	0,175	0,662	0,100	0,062

Source : Maxime Lamotte, *Bulletin Biologique de France et Belgique*, supplément 35, 1951.

Tableau 26-4. Fréquences des plantes à chromosomes surnuméraires et des hétérozygotes pour une translocation dans une population californienne de *Clarkia elegans*.

Pas de surnuméraires ni de translocations	Surnuméraires	Translocations	A la fois surnuméraires et translocations
0,560	0,265	0,133	0,042

Source : H. Lewis, *Evolution* 5, 1959, 142-57.

populations présentent aussi un polymorphisme du nombre de stries et de la grandeur des coquilles, mais les bases génétiques de ces caractères sont complexes.

Des exemples de variabilité morphologique chez des espèces végétales sont illustrés pour *Plectritis* (Figure 1-12), *Collinsia* («blue-eyed Mary», page xx) et le trèfle (Figure 4-5).

Polymorphisme chromosomique. Quoique le caryotype soit souvent présenté comme caractéristique d'une espèce, un polymorphisme du nombre et de la morphologie des chromosomes existe chez nombre d'entre elles. Des chromosomes surnuméraires, des translocations réciproques et des inversions ségrègent dans des populations de plantes, d'insectes et même de mammifères.
Les fréquences d'apparition de chromosomes surnuméraires et d'hétérozygotes pour une translocation dans une population californienne de la plante *Clarkia elegans* sont reprises au tableau 26-5. Le caryotype «type» de l'espèce serait difficile à identifier.

Polymorphisme immunologique. Chez les vertébrés, de nombreux loci codent pour des antigènes spécifiques semblables à ceux des groupes sanguins ABO. 40 antigènes différents environ ont été identifiés chez les globules rouges humains, et plusieurs centaines chez les bovins. Un autre groupe polymorphique présent chez l'homme est le système HLA des antigènes cellulaires, qui sont impliqués dans les compatibilités tissulaires lors de greffes (chapitre 17). Les fréquences alléliques au locus des groupes sanguins ABO pour différentes populations humaines sont fournies au tableau 26-5. Le polymorphisme du système HLA est bien plus étendu; essentiellement, deux loci le déterminent, chacun d'entre eux comportant cinq allèles distincts. Cela conduit à $5^2 = 25$ types de gamètes possibles, résultant en 25 formes homozygotes différentes et $(25)(24)/2 = 300$ hétérozygotes différents. Tous ces génotypes ne peuvent être distingués phénotypiquement, de telle sorte que seules 121 classes phénotypiques ont été identifiées. Dans un échantillon de 100 Européens, L.L. Cavalli-Sforza et W.F. Bodmer ont pu observer 53 des 121 phénotypes possibles!

Tableau 26-5. Fréquence des allèles I^A, I^B et i pour le locus des groupes sanguins ABO dans diverses populations humaines.

Population	I^A	I^B	i
Esquimau	0,333	0,026	0,641
Sioux	0,035	0,010	0,955
Belge	0,257	0,058	0,684
Japonais	0,279	0,172	0,549
Pigmée	0,227	0,219	0,554

Source : W. C. Boyd, *Genetics and the Races of Man.* D. C. Heath, 1950.

Polymorphisme protéique. Au cours des dernières années, l'étude du polymorphisme génétique a atteint le niveau des polypeptides codés par les gènes de structure. Si une modification d'un codon d'un gène de structure (disons, GGU en GAU) se produit, cela entraînera une substitution d'un acide aminé dans le polypeptide correspondant (dans ce cas, la glycine est changée en acide aspartique). Si une protéine spécifique pouvait être purifiée et séquencée à partir d'individus distincts, il nous serait possible de détecter la variation génétique d'une population à ce niveau. En pratique, c'est une tâche fastidieuse pour de grands organismes et impossible pour de petits, sauf si une grande quantité de protéines peut être obtenue à partir d'une lignée homozygote.

Une alternative pratique au séquençage existe. Cependant, elle est basée sur le changement des propriétés physiques d'une protéine lorsqu'un de ses acides aminés est modifié. Cinq acides aminés (l'acide glutamique, l'acide aspartique, l'arginine, la lysine et l'histidine) présentent des chaînes latérales ionisables qui confèrent à la protéine une charge nette caractéristique, dépendant du pH du milieu environnant. Des substitutions d'acides aminés peuvent remplacer l'un de ces acides aminés chargés; une substitution neutre près de l'un de ceux-ci peut affecter le niveau d'ionisation de l'acide aminé chargé; ou encore, une substitution au niveau de l'association de deux hélices a peut entraîner une légère modification de la configuration tri-dimensionnelle du polypeptide. Dans tous ces cas, la charge nette du polypeptide sera altérée puisque la charge nette d'une protéine n'est pas uniquement due à la somme de toutes les charges individuelles de ses acides aminés mais dépend aussi de la façon dont elles sont exposées dans le milieu liquide qui les entoure.

Pour déceler de tels changements de charge nette, la protéine peut être soumise à une électrophorèse sur gel. La figure 26-2 présente le résultat d'une telle séparation électrophorétique de variants pour un enzyme de type estérase chez *D. pseudoobscura*. Chaque piste comporte la protéine d'un seul individu. La figure 26-3 représente un gel similaire pour différentes hémoglobines humaines. Dans ce cas, chaque individu est hétérozygote pour l'hémoglobine de type variant et de type normal A. Le tableau 26-6 donne les fréquences des différents allèles pour trois loci codant pour des enzymes chez *D. pseudoobscura* dans plusieurs populations : un locus quasiment monomorphique (la déshydrogénase malique), un locus modérément polymorphique (l'a-amylase) et un locus hautement polymorphique (la xanthine déshydrogénase) peuvent être identifiés.

BCU LAUSANNE LIBRARY

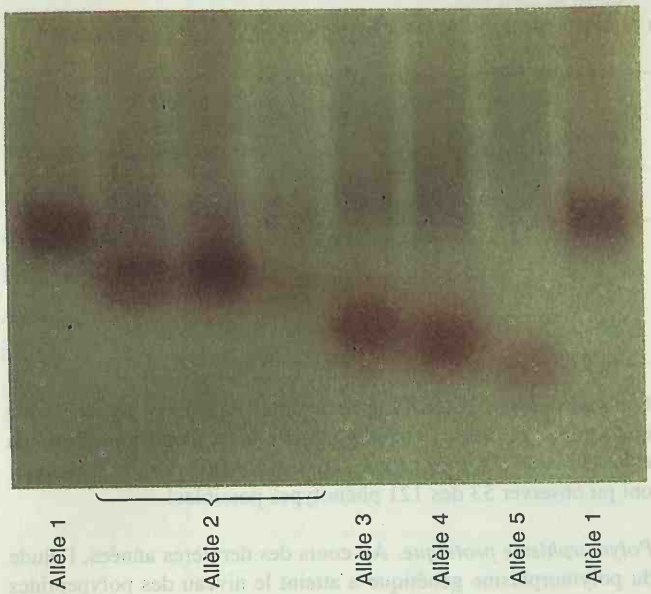


Figure 26-2. Gel d'électrophorèse obtenu à partir d' homozygotes pour trois allèles différents au locus estérase-5 de *Drosophila pseudoobscura*. Plusieurs échantillons du même allèle sont bien identiques, mais des différences reproductibles s'observent entre allèles.

La technique d'électrophorèse sur gel (ou de séquençage) diffère fondamentalement d'autres méthodes d'analyse génétique en ce sens qu'elle permet l'étude de loci qui ne ségrègent pas, la présence d'un polypeptide donné constituant une preuve valable de l'existence du gène de structure correspondant. Il a donc été possible de se demander quelle proportion des gènes de structure étaient polymorphes dans le génome d'une espèce et quelle était l'hétérozygotie moyenne d'une population. Un très grand nombre d'espèces ont été analysées par cette méthode, y compris des bactéries, des champignons, des plantes supérieures, des vertébrés et des invertébrés. Les résultats sont remarquablement constants au travers des espèces. Environ un tiers des loci de gènes de structure sont polymorphiques, et l'hétérozygotie moyenne d'une population pour tous les loci testés est d'environ 10 pour cent. Ceci signifie que l'analyse du génome chez pratiquement n'importe quelle espèce montrerait qu'un locus sur dix est hétérozygote et qu'environ un tiers de tous les loci comportent deux ou plusieurs allèles ségrégeant dans la population. Ceci constitue un immense potentiel de variation pour l'évolution. Le désavantage de la technique d'électrophorèse est de ne déceler la variation que pour les gènes de structure. Si la plus grande part de l'évolution au niveau de la morphologie, de la physiologie et du comportement reposait sur des modifications d'éléments génétiques de régulation, la variation observée dans les gènes de structure serait dépourvue de signification.

Polymorphisme des séquences d'ADN

Des progrès récents dans les techniques d'analyse de l'ADN ont rendu possible l'étude de la variation des séquences d'ADN entre individus et entre espèces. Ces études peuvent se réaliser à deux niveaux. Une idée relativement grossière de la variation au niveau des paires de base peut s'obtenir en se basant sur la variation des sites de restriction. D'une façon plus fine, les méthodes de séquençage d'ADN permettent de déceler la variation pour chaque paire de base.

Variation des sites de restriction. Un enzyme de restriction à six sites de coupure reconnaîtra la séquence spécifique de six bases environ une fois toutes les $4^6 = 4096$ paires de bases d'une molécule d'ADN (établi à partir de la probabilité qu'une base spécifique (dont quatre sont représentées) sera présente à chacune des

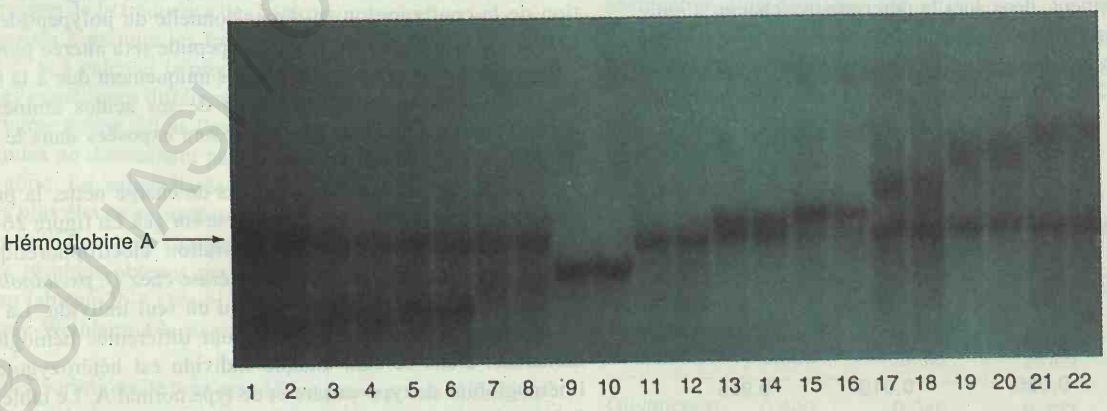


Figure 26-3. Gel d'électrophorèse montrant des hétérozygotes pour l'hémoglobine normale A et un certain nombre d'allèles variants. L'une des bandes colorées intensément correspond à l'hémoglobine A. La seconde bande bien colorée dans chaque piste (très marquée dans les pistes 3 et 4) représente la seconde protéine, due au second allèle de l'hétérozygote. L'hémoglobine A n'est pas présente dans les pistes 9 et 10 parce qu'il s'agit d'homozygotes pour l' allèle variant. (La bande faiblement colorée située vers le haut du gel dans toutes les pistes est une protéine d'un autre type que l'hémoglobine).

BCU IASI CENTRUL UNIVERSITAR

Tableau 26-6. Fréquences de divers allèles à trois loci codant pour des enzymes dans quatre populations de *Drosophila pseudoobscura.*

		Population			
Locus (codant pour un enzyme)	Allèle	Berkeley	Mesa Verde	Austin	Bogota
Déshydrogénase malique	*A*	0,969	0,948	0,957	1,00
	B	0,031	0,052	0,043	0,00
α-Amylase	*A*	0,030	0,000	0,000	0,00
	B	0,290	0,211	0,125	1,00
	C	0,680	0,789	0,875	0,00
Xanthine déshydrogénase	*A*	0,053	0,016	0,018	0,00
	B	0,074	0,073	0,036	0,00
	C	0,263	0,300	0,232	0,00
	D	0,600	0,581	0,661	1,00
	E	0,010	0,030	0,053	0,00

Source : R. C. Lewontin, *The Genetic Basis of Evolutionary Change,* Columbia University Press, 1974.

six positions). Si un polymorphisme existe dans la population pour l'une des six bases du site de reconnaissance, un polymorphisme de longueur de fragments de restriction sera présent dans la population, puisque chez un variant l'enzyme reconnaîtra et coupera l'ADN, alors que dans l'autre variant ce ne sera pas le cas (voir pages XX- XX). Un ensemble de, disons, huit enzymes testera chaque 4096/8 ≈ 500 paires de bases pour l'existence de tels polymorphismes. Lorsqu'un tel cas est trouvé, nous ne savons cependant pas laquelle des six paires de base est polymorphique.

En faisant usage d'enzymes qui reconnaissent des séquences de quatre bases, un site de reconnaissance sera représenté à chaque 4^4 = 256 paires de base, de sorte qu'un ensemble de huit enzymes différents peut agir à chaque 32 paires de base. Outre les simples changements de paires de base, qui détruisent les sites de reconnaissance des enzymes de restriction, des insertions et des délétions de segments d'ADN peuvent aussi entraîner des variations dans la longueur de fragments de restriction.

Des échantillonages étendus ont été réalisés pour plusieurs régions du genome chez un certain nombre d'espèces de *Drosophila* en utilisant aussi bien des enzymes à quatre qu'à six sites de coupure. Le résultat d'une telle étude portant sur le gène de la xanthine déshydrogénase chez *Drosophila pseudoobscura* est montré à la Figure 26-4. La figure présente symboliquement le profil de restriction d'un échantillon de 53 chromosomes prelevé dans la nature et polymorphique pour 78 sites de restriction distribué le long d'une séquence de 4,5 kb. 48 sur 53 des haplotypes sont différents. (Le lecteur est invité à trouver les paires identiques). Il est très clair qu'une immense variation existe dans la nature au sein des nucléotides du locus codant pour la xanthine déshydrogénase.

Vingt études de régions variées du chromosome X et des deux grands autosomes de *Drosophila melanogaster* par des enzymes de restriction ont décelé entre 0,1 et 1 pour cent d'hétérozygotie par site nucléotidique, avec une moyenne de 0,4 pour cent. Une étude portant sur le très petit chromosome quatre n'a cependant pas permis d'y découvrir du polymorphisme.

Séquences répétées en tandem. Une autre forme de variation des séquences d'ADN décelée par l'évaluation des fragments de restriction provient de l'existence en grand nombre de séquences d'ADN répétées . Chez le génome humain, il existe une variété de courtes séquences d'ADN différentes, dispersées au sein du génome, chacune d'entre elle étant répétée un grand nombre de fois en tandem. Le nombre de séquences répétitives peut varier d'une douzaine à plus de 100 chez des génomes différents. Ces séquences sont connues comme des **motifs répétés en tandem en nombre variable (VNTR).** Si l'ADN est coupé par des enzymes de restriction au niveau de sites flanquant de telles zones en tandem, un fragment sera produit dont la taille est proportionnelle au nombre d'éléments répétitifs. Les fragments de différentes tailles migreront à des positions variables dans un gel d'électrophorèse Malheureusement, les différences individuelles sont trop petites pour pouvoir distinguer disons, entre 64 et 68 motifs répétés, mais des classes de taille peuvent être établies et une population peut être évaluée pour les fréquences des différentes classes. Le tableau 26-7 donne les résultats pour deux VNTR différents provenant de deux groupes amérindiens du Brésil. Dans l'un de cas, D14S1, les Karitiana sont presque homogènes alors que les Surui sont très variables, tandis que chez l'autre D14S13, les deux populations sont variables mais avec des profils de fréquence bien différents.

Variation de l'ensemble de la séquence. Des études portant sur la variation de simples paires de base par séquenage d'ADN peuvent fournir des informations de deux types. D'abord, en traduisant les séquences des régions codantes obtenues chez différents individus dans une population ou à partir d'espèces différentes, les différences précises entre séquences d'acides aminés peuvent être déterminées. Les données électrophorétiques montrent qu'il y a bien une variation dans les séquences d'acides aminés mais ne peuvent identifier combien ou quels acides aminés diffèrent d'un individu à l'autre. De sorte que, lorsque des séquences d'ADN furent obtenues pour différents variants electrophorétiques de l'estérase-5 chez *Drosophila pseudoobscura* (voir Figure 26-2), on

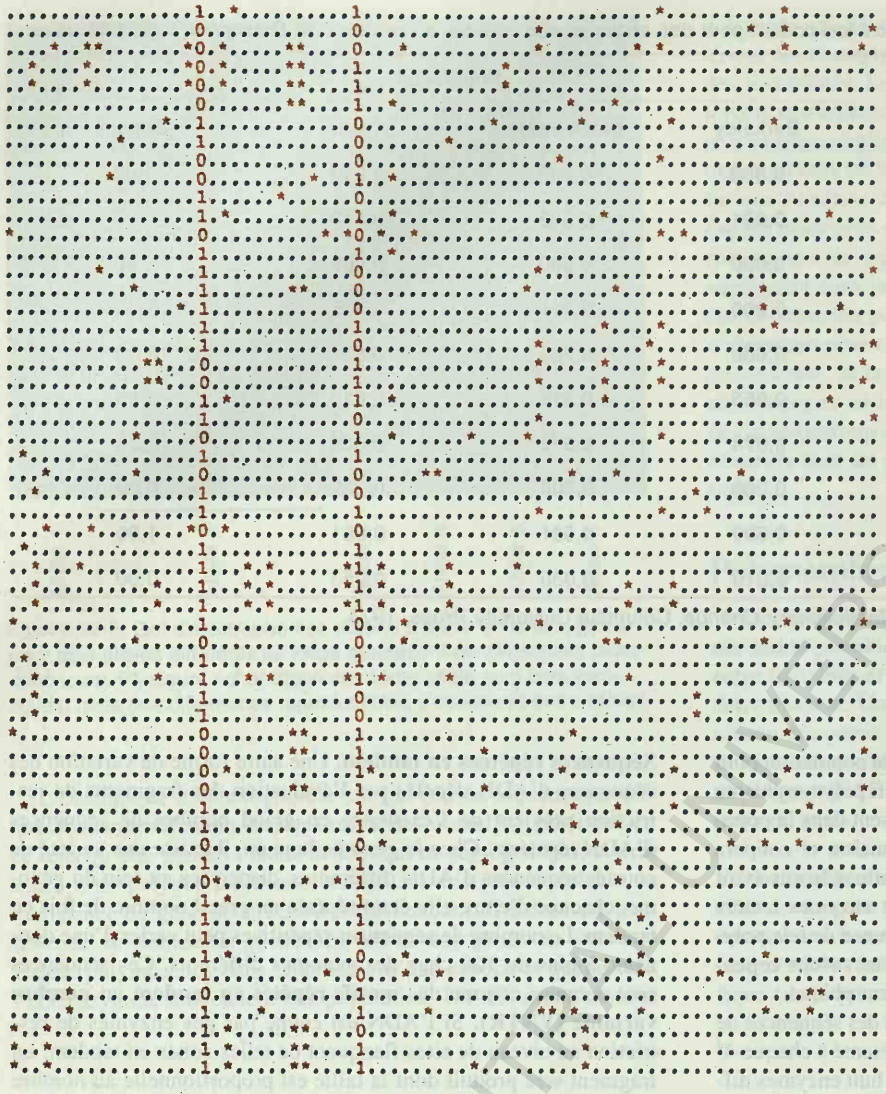


Figure 26-4. Résultat d'une étude, faisant usage d'un enzyme reconnaissant quatre paires de bases, portant sur 53 chromosomes testés pour le gène de la xanthine déshydrogénase chez *Drosophila pseudoobscura*. Chaque ligne désigne un chromosome (haplotype) obtenu à partir d'une population naturellle. Chaque point représente un site de restriction polymorphique le long de la séquence envisagée de 4,5 kb. Là où un astérisque est indiqué, l'haplotype diffère de la majorité, soit parce qu'il est scindé là où la plupart des haplotypes ne le sont pas, ou n'est pas scindé alors que la plupart des haplotypes le sont. Pour deux sites il n'y a pas de type majoritaire clair, de sorte que l'on utilise 0 ou 1 pour indiquer si le site est présent ou absent.

s'aperçut que les classes éléctrophorétiques différaient l'une de l'autre en moyenne de 8 acides aminés, et les 20 types différents d'acides aminés étaient responsables du polymorphisme, environ à la fréquence de leur présence dans la protéine. De telles études ont montré aussi que les différentes régions d'une même protéine diffèrent dans leur niveau de polymorphisme. Pour la protéine estérase-5, qui comporte 545 acides aminés, 7 pourcent des acides aminés sont polymorphiques, mais les derniers acides aminés du côté carboxyl-terminus de la protéine ne varient aucunement entre individus, probablement en raison de contraintes fonctionnelles portant sur ces acides aminés.

En second lieu, l'étude de la variation de l'ADN peut aussi concerner les paires de base dont les changements n'affectent pas la séquence protéinique. Cela inclut l'ADN des introns, des séquences 5' flanquantes pouvant jouer un rôle de régulation, de la partie 3' non-transcrite du gène, et de ces nucléotides généralement situés en troisième position dans les codons dont la variation n'entraîne pas de substitutions d'acides aminés. Au sein des séquences codantes, ce polymorphisme de paires de base dit silencieux (ou synonyme) est bien plus répandu que les modifications suivies d'un changement au niveau des acides aminés, vraisemblablement parce que, dans de nombreux cas un changement dans les acides aminés perturbe la fonction normale de la protéine et est éliminé par sélection naturelle. L'examen de la table de traduction des codons (page 397) montre qu'environ 25 pour cent de tous les changements au hasard de paires de base seraient synonymes, donnant lieu à un codon différent mais codant pour le même acide aminé, alors que 75 pour cent de changements aléatoires modifierait le type d' acide aminé codé. Par exemple, le changement de AAT en AAC ne modifie pas le code pour l'asparagine, mais un changement en ATT, ACT, AAA, AAG, AGT, TAT, CAT ou GAT, se caractérisant tous par une seule altération du codon AAT, modifie l'acide aminé codé. Donc, si des mutations de paires de base se déroulent au hasard et si la substitution d'un acide aminé n'entraîne pas de modification dans la fonction, nous pourrions nous attendre à un rapport 3:1 entre les cas de changement d' acides aminés et les cas de polymorphisme sans effets. Les rapports réels trouvés chez *Drosophila* varient en fait de 2:1 jusqu'à 1 : 10. Visiblement, il y a un fort excès de polymorphisme sans effets (ou dit synonyme), ce qui implique que la plupart des modifications d'acides aminés sont soumis à la sélection naturelle. Nous ne devons cependant pas supposer que des sites silencieux au sein des séquences codantes sont libres de toute contrainte. Des triplets alternatifs différents codant pour le même acide aminé peuvent être transcrite de manière variable, et l'ARN messager correspondant à ces différents triplets peut être traduit plus ou moins préci-

Tableau 26-7. Fréquences de classes de longueurs de 2 séquences VTNR différentes, D14S1 et D14S13, chez les Karitiana et les Surui de Brésil.

Longueur des classes en kb	D14S1 Karitiana	D14S13 Surui	Karitiana	Surui
3-4	105	4	0	0
4-5	0	3	3	14
5-6	0	11	1	4
6-7	0	2	1	2
7-8	0	1	1	2
8-9	3	3	8	16
9-10	0	11	28	9
10-11	0	2	22	0
11-12	0	4	18	8
12-13	0	0	13	18
13-14	0	0	13	3
>14	0	0	0	2
	108	78	108	78

Source : Données de J. Kidd et K. Kidd, *American Journal of Physical Anthropology* 81, 1992, 249.

sement et plus ou moins rapidement en raison des limitations du pool d'ARN de transfert disponibles. En faveur de l'existence de ce dernier effet peut se mentionner le fait que des triplets synonymes pour un acide aminé ne sont pas utilisés de façon similaire, et que l'inégalité dans leur usage est bien plus prononcée pour des gènes transcrits à des taux élevés.

Des contraintes s'exercent aussi sur des séquences non-codantes 5' et 3' et sur des séquences d'introns. Les ADN non-codants en 5' et 3' contiennent tous deux des signaux impliqués dans la transcription, et des introns peuvent contenir des éléments activateurs de la transcription (voir chapitre 17).

Message Une importante variation génétique existe au sein des espèces. Elle se manifeste au niveau de la structure et du nombre de chromosomes et aussi des segments d'ADN sans nécessairement entraîner des effets décelables sur le développement.

La variation au sein des populations et entre elles

Les exemples que nous venons de décrire montrent l'existence de différences génétiques entre individus au sein d'une population ainsi que de différences de fréquences d'allèles entre populations. Les niveaux relatifs de variation au sein des populations et entre elles varient d'une espèce à une autre et dépendent à la fois de l'histoire de ces espèces et de leur environnement. Chez l'homme, les fréquences de certains gènes (par exemple, ceux déterminant la couleur de la peau ou la forme du cheveu) diffèrent manifestement entre les populations et les groupes géographiques importants (appelés «races» géographiques). Si, toutefois, nous considérons des gènes structuraux uniques, caractérisés par immunologie ou par électrophorèse, plutôt que des caractères phénotypiques externes, la situation s'avère différente. Le tableau 26-8 présente les fréquences d'allèles dans un échantillon aléatoire de loci contrôlant des enzymes (choisis pour la facilité de leur détermination expérimentale) dans une population européenne et une africaine. Excepté dans le cas de la phosphoglucomutase–3, où les fréquences d'allèles ont une répartition inversée dans les deux populations, les Blancs et les Noirs ont des distributions alléliques très semblables. Contrastant avec cet échantillon de loci pris au hasard, le tableau 26-9 reprend les trois loci pour lesquels les Caucasiens, les Négroïdes et les Mongoloïdes sont connus comme étant les plus différents les uns des autres (les groupes sanguins Duffy et Rhésus et l'antigène P) ainsi que trois loci polymorphiques pour lesquels ces races sont les plus semblables (le groupe sanguin Auberger et Xg et des facteurs de sécrétion). Même dans le cas des loci les plus divergents, aucune des races n'est homozygote pour un allèle qui serait absent dans les deux autres races.

En général, des populations humaines différentes se caractérisent par des fréquences relativement semblables de gènes polymorphiques. La figure 26-5 présente sous forme d'un *diagramme*

Tableau 26-8. Fréquences alléliques à sept loci polymorphes chez des Européens et des Noirs africains.

	Européens			Africains		
Locus	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3
Phosphatase acide	0,36	0,60	0,04	0,17	0,83	0,00
Phosphoglucomutase-1	0,77	0,23	0,00	0,79	0,21	0,00
Phosphoglucomutase-3	0,74	0,26	0,00	0,37	0,63	0,00
Adénylate kinase	0,95	0,05	0,00	1,00	0,00	0,00
Peptidase A	0,76	0,00	0,24	0,90	0,10	0,00
Peptidase D	0,99	0,01	0,00	0,95	0,03	0,02
Adénosine désaminase	0,94	0,06	0,00	0,97	0,03	0,00

Source : R. C. Lewontin, *The Genetic basis of Evolutionary Change*, Columbia University Press, 1974. Adapté de H. Harris, *The*

Tableau 26-9. Un exemple de différenciation extrême et de similitude étroite entre les fréquences d'allèles des groupes sanguins dans trois groupes raciaux.

		Population		
Gène	Allèle	Caucasoïde	Négroïde	Mongoloïde
Duffy	*Fy*	0,0300	0,9393	0,0985
	Fy^a	0,4208	0,0000	0,9015
	Fy^b	0,5492	0,0607	0,0000
Rhésus	R_0	0,0186	0,7395	0,0409
	R_1	0,4036	0,0256	0,7591
	R_2	0,1670	0,0427	0,1951
	r	0,3820	0,1184	0,0049
	r'	0,0049	0,0707	0,0000
	autres	0,0239	0,0021	0,0000
P	P_1	0,5161	0,8911	0,1677
	P_2	0,4839	0,1089	0,8323
Auberger	Au^a	0,6213	0,6419	pas de donnée
	Au	0,3787	0,3581	pas de donnée
Xg	Xg^a	0,67	0,55	0,54
	Xg	0,33	0,45	0,46
Secréteur	*Se*	0,5233	0,5727	pas de donnée
	se	0,4767	0,4273	pas de donnée

Source : Un résumé est donné dans L. L. Cavalli-Sforza et W.F. Bodmer, *The Genetics of Human Populations,* W. H. Freeman and Company, 1971, pp. 724-31. Voir L. L. Cavalli-Sforza, P. Menozzi et A. Piazza, *The History and Geography of Human Genes* (Princeton University Press, 1994),pour plus de détails.

triallélique les trois principales classes alléliques I^A, I^B et i du système des groupes sanguins ABO. Chaque point représente la composition allélique d'une population, où les trois fréquences alléliques peuvent se lire en prenant les longueurs des perpendiculaires du point à chacun des côtés. Le diagramme montre que toutes les populations humaines se regroupent dans la région où la fréquence de i est élevée, celle de I^A, intermédiaire, et celle de I^B basse. En outre, des points voisins (entourés d'un pointillé) ne correspondent pas à des races géographiques, de sorte que ces dernières ne peuvent être distinguées sur la base des fréquences alléliques de ce gène. L'étude du polymorphisme des groupes sanguins et de loci contrôlant des enzymes chez toute une série de populations humaines a montré qu'environ 85 pour cent de la diversité génétique se retrouvent au sein de populations locales, qu'à peu près 8 pour cent s'observent entre des populations locales au sein des principales races géographiques et les 7 pour cent restants entre les principales races géographiques. Très clairement, les gènes associés à la couleur de la peau, la forme des cheveux et du visage, qui sont bien différenciés entre ne représentent pas un échantillon de loci de gènes de structure pris au hasard.

Message En général, la variation génétique entre individus au sein des races géographiques est plus grande que la variation moyenne entre races.

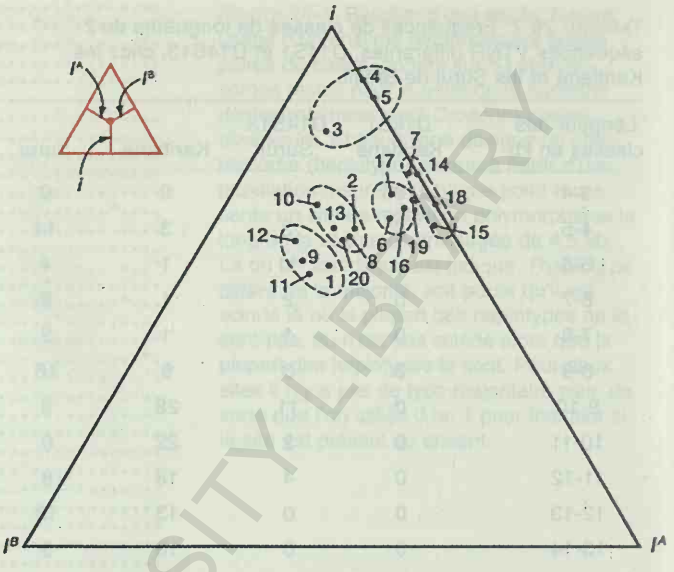


Figure 26-5. Diagramme triallélique de fréquences d'allèles du groupe sanguin ABO chez des populations humaines. Chaque point représente une population : les longueurs des perpendiculaires de chaque point aux côtés représentent les fréquences alléliques, comme indiqué dans le petit triangle. Les populations 1 à 3 sont africaines; 4 à 7 amérindiennes, 8 à 13 asiatiques, 14 à 15 aborigènes d'Australie et 16 à 20 européennes. Les pointillés délimitent des classes arbitraires aux fréquences géniques similaires; ces regroupements ne correspondent pas aux classes «raciales» (D'après A. Jacquard, *Structures génétiques des populations.* Copyright 1970 chez Masson et Cie.).

La variation quantitative

L'ensemble de la variation des caractères quantitatifs ne peut se décrire sous forme de fréquences alléliques puisque de nombreuses caractéristiques, comme la taille, varient de façon continue plutôt que de se répartir dans un petit nombre de classes qualitativement distinctes. Il n'y a pas d'allèles responsables d'une taille d' 1m60 ou d' 1m80. De tels caractères, s'ils varient suite à la variation génétique, seront influencés par de nombreux gènes aussi bien que par la variation due au milieu. Des techniques particulières sont nécessaires à l'étude de tels **caractères quantitatifs** et le chapitre 27 leur est consacré. Pour l'instant nous nous contenterons de poser la question de savoir si des différences génétiques entre individus peuvent influencer ce type de caractère. Une façon simple de répondre à cette question consiste à choisir chez des organismes expérimentaux deux groupes de parents qui diffèrent nettement pour le caractère et d'obtenir des descendants des deux groupes dans un même milieu. Si les descendants issus des deux groupes sont différents, le caractère est dit héritable (voir chapitre 27 pour une discussion plus fouillée du concept et de l'estimation de l'héritabilité). Le rapport entre la différence entre descendants à la différence entre groupes parentaux est une mesure simple du degré d'héritabilité. Ainsi, si deux groupes parentaux de *Drosophila* diffèrent, disons de 0,1 mg en poids alors que les descendants, élevés dans des milieux identiques, diffèrent de 0,03 mg, l'héritabilité de la différence de poids sera estimée à 30 pourcent. Quand cette technique a été appliquée à la variation morphologique chez *Drosophila*, pratiquement chaque caractère variable s'est trouvé présenter une cer-

RESEARCH CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

taine héritabilité, de telle sorte que le caractère peut évoluer. Il est important de souligner que cette méthode ne peut s'appliquer à des organismes où un controle rigoureux du milieu dans lequel ils se développent ne peut s'envisager. Chez l'homme, par exemple, des enfants de groupes parentaux différents diffèrent les uns des autres non seulement du fait de leur constitution génétique, mais aussi en raison des différences de milieu existant entre familles, classes sociales et nations. Les Japonais sont en moyenne plus petits que les Européens, mais la différence entre enfants d'origine japonaise et d'origine européenne, tous deux nés en Amérique du Nord, est moindre et s'amenuise encore à la deuxième génération, probablement en raison de l'alimentation. Il n'est pas clair si ces différences de taille disparaîtraient ou même s'inverseraient si les milieux familiaux étaient identiques.

Il ne faudrait pas cependant en conclure que tous les caractères variables sont héréditaires. Certains caractères métaboliques (comme la résistance à de fortes concentrations de sel chez *Drosophila*) présentent une variation individuelle mais pas d'héritabilité. L'asymétrie gauche-droite est aussi non-héréditaire : les mouches dont les ailes gauches sont légèrement plus longues que les ailes droites ne comportent pas plus de descendants à aile gauche allongée que ne le font les mouches à aile droite allongée. En général, les caractères comportementaux ont une héritabilité plus faible que les caractères morphologiques, surtout chez les organismes à système nerveux central complexe, à très grande flexibilité individuelle. Avant de poser un quelconque jugement sur l'évolution d'un caractère quantitatif particulier, il est essentiel d'établir s'il possède une variance génétique dans la population dont on veut prédire l'évolution. Par exemple toute suggestion d'après laquelle des caractères de l'espèce humaine tels que les performances dans les tests QI, le tempérament et l'organisation sociale sont en train d'évoluer ou ont évolué à des époques données de l'histoire de l'humanité, dépend de l'existence de données solides concernant la base génétique de la variation de ces caractères.

L'une des découvertes essentielles de la génétique évolutive a été la mise en évidence d'une variation génétique substantielle pour des caractères ne montrant pas de variation morphologique! Ils sont dénommés **caractères canalisés** puisque l'aboutissement de leur développement est maintenu dans des limites étroites en dépit de facteurs perturbants. Le développement est tel que tous les différents génotypes de caractères canalisés ont le même phénotype dans la gamme des milieux habituels de l'espèce. Les différences génétiques ne se révèlent que si les organismes sont placés dans un milieu stressant ou si une mutation sévère exerce une contrainte sur le développement. Par exemple, tous les individus sauvages de *Drosophila* sont pourvus de quatre soies scutellaires (figure 26-6). Si la mutation récessive *scute* est présente, le nombre de soies est réduit et varie de mouche à mouche. Cette variation est héréditaire et des lignées sans ou avec une soie comme des lignées à trois ou quatre soies peuvent être obtenues par sélection en présence de la mutation *scute*. Lorsque la mutation est éliminée, ces lignées présentent maintenant soit deux soit six soies. Des expériences du même type ont été menées en milieu stressant plutôt que dans un contexte mutant. Les résultats démontrent que la variation génétique peut affecter le nombre de soies mais que cette variation ne se manifeste pas au phénotype aussi longtemps que le développement normal de la mouche n'est pas perturbé. Une conséquence de cette variation cachée fait qu'un caractère qui est phénotypiquement uniforme chez une espèce peut néanmoins subir une évolution rapide si un environnement contraignant démasque la variation génétique.

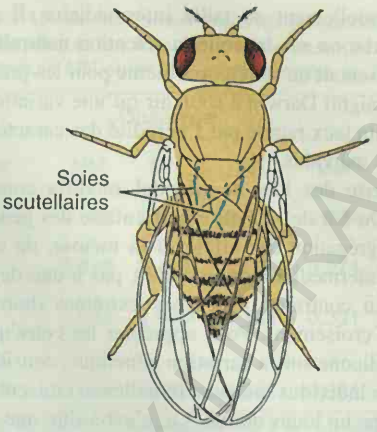


Figure 26-6. Les soies scutellaires chez la Drosophile adulte (en bleue). Il s'agit d'un exemple de caractère canalisé : tous les types sauvages de *Drosophila* possèdent quatre soies scutellaires, dans une large gamme de milieux.

Message Même des caractères sans variance phénotypique apparente peuvent évoluer lorsque les conditions du développement sont modifiées brutalement, pour autant que la variation génétique d'un tel caractère ait été masquée par la canalisation qu'impose le développement.

L'effet de la reproduction sexuée sur la variation

Les théoriciens de l'évolution du dix-neuvième siècle furent confrontés à un obstacle fondamental en voulant appliquer la théorie darwinnienne de l'évolution basée sur la sélection naturelle. La possibilité d'une évolution continue par sélection naturelle est en effet limitée par l'ampleur de la variation génétique. Mais les biologistes du dix-neuvième siècle, y compris Darwin, croyaient sous une forme ou une autre au principe de l'**hérédité par mélange**, un modèle postulant que les traits des descendants reflétaient quelque mélange des caractères parentaux. Un tel modèle d'hérédité a des implications fatales pour une théorie de l'évolution basée sur la variation.

Supposons qu'un certain trait (disons la taille) soit distribué dans la population et que les individus se croisent plus ou moins au hasard. Selon le modèle de l'hérédité par mélange, si des individus de caractère intermédiaire entre les deux parents s'apparient entre eux, ils ne donneront lieu qu'à des descendants de type intermédiaire. Le croisement d'un individu de taille élevée avec un individu de petite taille ne produira que des descendants de taille intermédiaire. Seules des unions entre individus de taille élevée d'une part et des unions entre individus de petite taille d'autre part maintiendront les types extrêmes (variation de la taille). Le résultat net de tous ces croisements serait l'augmentation des types intermédiaires et la baisse des types extrêmes. La variance de la distribution se rétrécirait, tout simplement suite à la reproduction sexuée. En fait, on peut montrer que la variance serait amputée de moitié à chaque génération, ce qui aboutirait en peu de générations à une

population essentiellement de taille intermédiaire. Il n'y aurait alors plus de variation sur laquelle la sélection naturelle pourrait jouer. Ceci représentait un sérieux problème pour les premiers darwinistes et contraignit Darwin à soutenir qu'une variation nouvelle est générée à un taux rapide par l'hérédité des caractères acquis durant la vie des individus.

La redécouverte des lois de Mendel modifia complètement cette situation. Du fait de la nature particulaire des gènes mendéliens et de la ségrégation des allèles à la méiose, un croisement entre individus intermédiaires ne conduit pas à une descendance intermédiaire. Au contraire, des types extrêmes (homozygotes) sont issus de ce croisement. Pour apprécier les conséquences de l'hérédité mendélienne sur la variation génétique, considérons une population où les individus mâles et femelles se croisent au hasard en ce qui concerne un locus donné *A,a*; c'est-à-dire que les individus ne choisissent pas préférentiellement leurs partenaires en fonction du génotype existant pour ce locus. De telles unions au hasard reviennent à mélanger tous les ovules et tous les spermatozoïdes présents dans la population et à les associer au hasard.

Si la fréquence de l'allèle *A* est p à la fois chez les spermatozoïdes et les ovules et la fréquence de l'allèle *a* est $q = 1\text{-}p$, les conséquences des unions au hasard de ces gamètes mâles et femelles sont décrites sur la figure 25-9. La probabilité que le gamète mâle et le gamète femelle soient tous deux porteurs de *A* est $p \times p = p^2$; p^2 sera donc la fréquence des homozygotes *AA* à la génération suivante. De façon similaire, la fréquence d'apparition des hétérozygotes *Aa* sera $(p \times q) + (q \times p) = 2pq$, et celle des homozygotes *aa* sera $q \times q = q^2$. Les trois génotypes, après une génération de croisements au hasard, se répartissent selon le rapport de fréquences $p^2 : 2pq : q^2$. Comme décrit sur la figure, la fréquence allélique de *A* n'a pas changé et demeure p. Il en résulte, qu'à la deuxième génération, les fréquences des trois génotypes seront à nouveau p^2: $2pq$: q^2, et ainsi de suite à jamais.

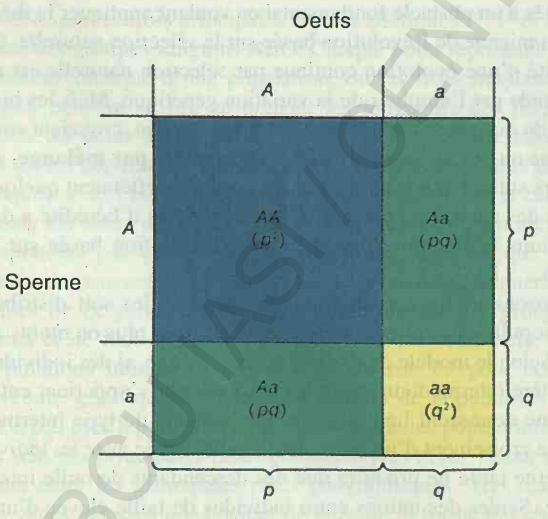


Figure 26-7. L'équilibre des fréquences de Hardy-Weinberg résultant de croisements au hasard. Les fréquences de *A* et *a* parmi les gamètes mâles et femelles sont respectivement p et q (=1-p). Les fréquences totales des génotypes zygotiques sont p^2 pour *AA*, $2pq$ pour *Aa* et q^2 pour *aa*. La fréquence de l'allèle *A* au sein des zygotes équivaut à la fréquence de *AA* plus la moitié de la fréquence de *Aa*, soit $p^2 + pq = p(p+q)=p$.

Message La ségrégation mendélienne fait que des croisements au hasard ont pour résultat une distribution en équilibre des génotypes, et ceci déjà après une seule génération, de telle sorte que la variation génétique se maintient.

La distribution à l'équilibre

$$\underset{p^2}{\underline{AA}} \qquad \underset{2pq}{\underline{Aa}} \qquad \underset{q^2}{\underline{aa}}$$

est dénommée **équilibre de Hardy-Weinberg**, d'après les noms de ceux qui le découvrirent de façon indépendante. (Cet équilibre fut aussi découvert indépendamment par le généticien russe Sergei Tschetverikov).

L'équilibre de Hardy-Weinberg signifie que la reproduction sexuée n'entraîne pas une réduction constante de la variation génétique à chaque génération : au contraire, le taux de variation demeure constant de génération en génération, en l'absence d'autres forces de changement. L'équilibre est la conséquence directe de la ségrégation des allèles à la méiose chez les hétérozygotes.

Numériquement, l'équilibre montre que, quel que soit le mélange de génotypes dans la génération parentale, la distribution génotypique après une seule génération de panmixie est déterminée par la fréquence allélique p. Par exemple, considérons trois populations hypothétiques, toutes caractérisés par la même fréquence de *A* (p= 0,3)

	f(*AA*)	f(*Aa*)	f(*aa*)
I	0,3	0,0	0,7
II	0,2	0,2	0,6
III	0,1	0,4	0,5

La fréquence allélique de *A* dans les trois populations est

I $\quad p = f(AA) + 1/2f(Aa) = 0,3 + 1/2(0) \quad = 0,3$

II $\quad p = \quad 0,2 + 1/2(0,2) = 0,3$

III $\quad p = \quad 0,1 + 1/2(0,4) = 0,3$

Donc, malgré leur composition génétique très différente, ces populations ont la même fréquence allélique. Cependant, après une génération de panmixie, chacune des trois populations se caractérisera par les mêmes fréquences génotypiques :

AA	*Aa*	*aa*
$(0,3)^2=0,09$	$2(0,3)(0,7)=0,42$	$(0,7)^2=0,49$

et elles se maintiendront ainsi indéfiniment.

Une autre conséquence des rapports de Hardy-Weinberg est que les allèles rares ne se trouvent virtuellement jamais en situation homozygote. Si un allèle a une fréquence de 0,001, il ne sera représenté comme homozygote qu'une fois sur un million; la plupart des copies d'allèles rares se retrouvent chez des hétérozygotes. En général, puisque deux copies d'un allèle sont représentées chez l'homozygote, mais une seule chez les hétérozygotes, la

BCU LAUSANNE - CENTRALE UNIVERSITAIRE

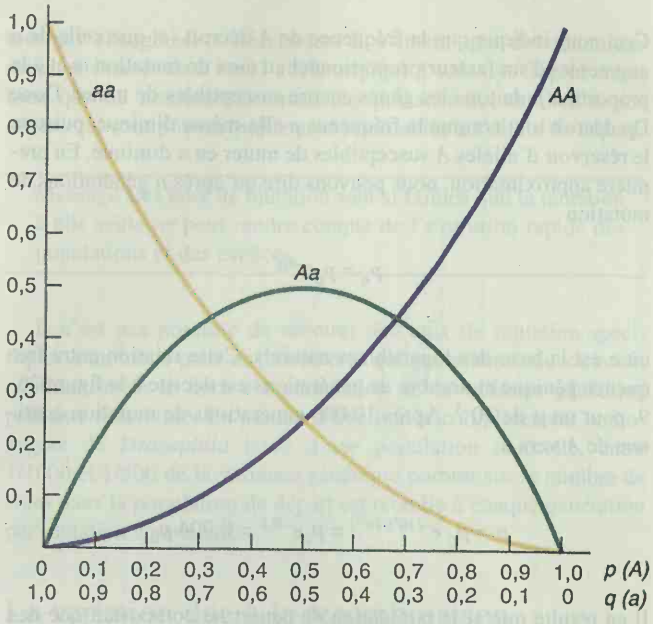


Figure 26-8. Courbes donnant les proportions d'homozygotes *AA* (ligne bleue), d'homozygotes *aa* (ligne jaune) et d'hétérozygotes *Aa* (ligne verte) dans des populations aux fréquences alléliques différentes, si les populations sont dans un état d'équilibre correspondant à la loi de Hardy-Weinberg.

relative de l'allèle chez les hétérozygotes (à l'opposé des homozygotes) est, selon les fréquences de l'équilibre d'Hardy-Weinberg

$$\frac{2pq}{2q^2} = \frac{p}{q}$$

ce qui pour $q = 0{,}001$ donne un rapport de 999 : 1. La relation générale entre les fréquences d'homozygotes et d'hétérozygotes est représentée en fonction des fréquences alléliques à la figure 26-8.

Dans notre dérivation de l'équilibre, nous tenons comme établi que la fréquence allélique *p* est la même chez les spermatozoïdes et les oeufs. L'équilibre d'Hardy-Weinberg ne s'applique pas aux gènes liés au sexe si les mâles et les femelles se trouvent dans une situation de départ où les fréquences de gènes sont inégales (voir le problème 7 à la fin de ce chapitre).

L'équilibre de Hardy-Weinberg se fonde sur l'hypothèse de «croisements au hasard», mais nous devons veiller à distinguer les deux significations de ce processus. Une première interprétation est de dire que les individus ne choisissent pas leurs partenaires en fonction d'un caractère héréditaire. En ce qui cocnerne les groupes sanguins, les unions entre êtres humains se présentent comme si le seul hasard y avait présidé, puisque les individus ne connaissent généralement pas le type sanguin de leur futur partenaire, et même s'ils le savaient, il est peu vraisemblable que le critère du groupe sanguin servairait à établir un choix. Dans ce premier cas, les unions se feront au hasard par rapport à des gènes qui n'ont pas d'effet sur l'aspect extérieur, le comportement, l'odeur, ou d'autres caractéristiques qui influencent directement le choix du partenaire.

Il y a une seconde signification d'union au hasard qui s'applique lorsque se produit une subdivision d'une espèce en sous-groupes. Si une différenciation génétique existe entre sous-groupes de telle sorte que les fréquences alléliques diffèrent d'un groupe à l'autre, et si les individus tendent à s'unir au sein de leur propre sous-groupe (**endogamie**), par rapport à l'espèce dans son ensemble, nous pouvons dire que les unions ne se présentent pas

Tableau 26-10. Comparaison entre les fréquences de génotypes observées et les fréquences attendues pour le locus du groupe sanguin MN suite à des croisements au hasard.

	Observée			Attendue		
Population	MM	MN	NN	MM	MN	NN
Esquimau	0,835	0,156	0,009	0,834	0,159	0,008
Egyptien	0,278	0,489	0,233	0,274	0,499	0,228
Chinois	0,332	0,486	0,182	0,331	0,488	0,181
Aborigène australien	0,024	0,304	0,672	0,031	0,290	0,679

Note : Les fréquences attendues ont été calculées d'après l'équilibre d'Hardly-Weinberg, en utilisant les valeurs de *p* et de *q* calculées à partir des fréquences observées.

au hasard et que les fréquences des génotypes s'écarteront plus au moins de fréquences prédites par Hardy-Weinberg. En ce sens, les êtres humains ne s'unissent pas au hasard puisque les groupes ethniques et raciaux diffèrent les uns des autres par les fréquences géniques, et montrent des taux élevés d'endogamie, non seulement au sein de groupes raciaux importants mais aussi dans des ethnies locales. Les Espagnols et les Russes diffèrent par la fréquence de leurs groupes sanguins ABO; les Espagnols épousent des Espagnoles, et les Russes des Russes, de sorte que les unions ne se réalisent plus au hasard quoique non-intentionnellement par rapport aux groupes sanguins ABO. Le tableau 26-10 fait état d'unions au hasard dans la première acception et d'unions non-au hasard dans la seconde acception dans le cas du groupe sanguin MN. Parmi les sous-populations d'Esquimaux, d'Egyptiens, de Chinois et d'Australiens, les femmes ne choisissent pas leurs partenaires en fonction du type HN et donc l'équilibre d'Hardy-Weinberg existe bien *au sein* de ces sous-populations. Mais les Egyptiennes n'épousent pas des Esquimaux ou des aborigènes australiens, de sorte que les unions non-au hasard dans l'espèce humaine *dans son ensemble* entraînent des différences marquées dans les fréquences de génotypes et par la même des écarts par rapport à l'équilibre d'Hardy-Weinberg.

Les sources de variation

Curieusement, la théorie de l'évolution basée sur l'existence de la variation est porteuse d'un germe d'auto-destruction. Si l'évolution se produit par la reproduction différentielle de variants, nous nous attendons à ce que le variant pourvu du taux de reproduction le plus élevé envahisse la population et que tous les autres génotypes disparaissent. Mais, dans ce cas, il n'y aurait plus de variation disponible pour une évolution ultérieure. La variation génétique alimente bien le processus évolutif, mais la reproduction différentielle utilise cette variation et de ce fait détruit les conditions nécessaires aux étapes évolutives ultérieures. La possibilité d'une évolution continue est dès lors dépendante d'un renouvellement de la variation.

Trois sources de variation se rencontrent dans une population donnée : la mutation, la recombinaison et la migration de gènes. Cependant, la recombinaison par elle-même ne donne pas lieu à variation sauf si des allèles de loci différents ségrègent déjà; sinon,

Tableau 26-11. Taux de quelques mutations ponctuelles chez différents organismes.

Organisme	Gène	Taux de mutation par génération
Bactériophage	Gamme d'hôtes	$2{,}5 \times 10^{-9}$
Escherichia coli	Résistance au phage	2×10^{-8}
Zea mays (maïs)	R(couleur)	$2{,}9 \times 10^{-4}$
	Y(grains jaunes)	2×10^{-6}
Drosophila		
melanogaster	létal moyen	$2{,}6 \times 10^{-5}$

Source : T. Dobzhansky, *Genetics and the Origin of Species*, 3e édition, revue. Columbia University Press, 1951.

il n'y a pas matière à recombinaison, et la migration ne peut être une source de variation si l'ensemble de l'espèce est homozygote pour le même allèle. En fin de compte, la source de toute variation se trouve dans la mutation.

La variation due aux mutations

Les mutations sont *la source* des variations, mais le *processus* de mutation n'est pas lui-même le moteur de l'évolution. Le taux de modification des fréquences géniques par mutation est très faible puisque les taux de mutations spontanées sont eux-mêmes faibles (tableau 26-11). Désignons par m le **taux de mutation** de l'allèle A en un autre allèle a (la probabilité qu'une copie du gène A mute en a au cours de la méiose). Si p_t est la fréquence de l'allèle A à la génération t, si $q_t = 1 - p_t$ est la fréquence de l'allèle a et si aucune autre cause de modification de la fréquence allélique ne se présente (pas de sélection naturelle, par exemple), le changement de la fréquence allélique en une génération sera

$$\Delta p = p_t - p_{t-1} = \mu p_{t-1}$$

Ceci nous indique que la fréquence de A décroît (et que celle de a augmente) d'un facteur proportionnel au taux de mutation m et à la proportion p de tous les gènes encore susceptibles de muter. Donc Dp décroît tout comme la fréquence p elle-même diminue, puisque le réservoir d'allèles A susceptibles de muter en a diminue. En première approximation, nous pouvons dire qu'après n générations de mutation

$$p_n = p_0 e^{-n\mu}$$

où e est la base des logarithmes naturels. Cette relation entre fréquence génique et nombre de générations est décrite à la figure 26-9, pour un μ de 10^{-5}. Après 10.000 générations de mutation continue de A vers a

$$p = p_0\, e^{-(10^4)(10^{-5})} = p_0 e^{-0{,}1} = 0{,}904\, p_0$$

Il en résulte que si la population de départ ne comportait que des allèles A ($p_0 = 1{,}0$), elle ne contiendrait que 10 pour cent d'allèles a après 10.000 générations et ceci pour un taux de mutation relativement élevé. 60.000 générations supplémentaires seraient requises pour réduire p à 0,5. Même si les taux de mutation étaient doublés (disons, par des mutagènes présents dans le milieu), le taux d'évolution resterait lent. Par exemple, les niveaux de radiation d'une intensité suffisante pour doubler le taux de mutation au cours de la période de reproduction d'un être humain devraient être supérieurs à la dose létale de sorte qu'un changement génétique rapide dans l'espèce ne peut être attribué à l'augmentation des radiations. Bien qu'une élévation de la radiation ambiante puisse être lourde de conséquences néfastes, nous ne devons pas craindre qu'elle nous transforme en monstres.

Si nous considérons maintenant l'accroissement de la fréquence d'un nouvel allèle plutôt que la diminution de son ancienne forme, le processus est encore plus lent. La plupart des taux de mutation qui ont été déterminés sont la somme de toutes les mutations de A vers n'importe quelle forme mutante décelable. La fréquence de toute substitution *spécifique* de base est vraisemblablement inférieure d'au moins deux ordres de grandeur à la somme de

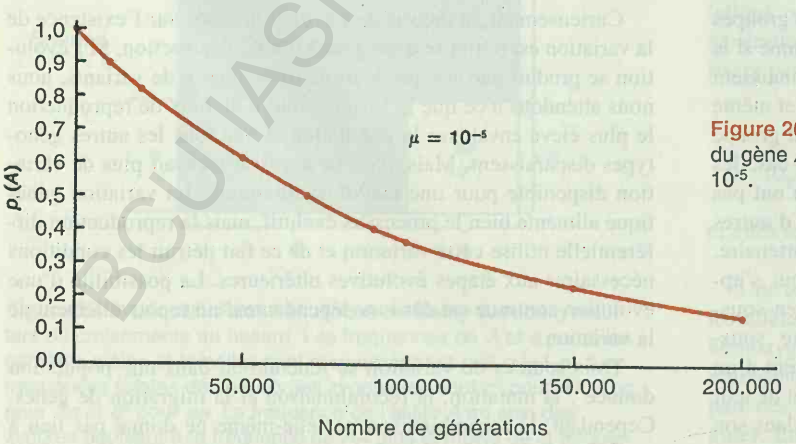


Figure 26-9. Changement au cours des générations de la fréquence du gène A dû à la mutation de A vers a à un taux (μ) constant de 10^{-5}.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

tous les changements décelables. Il s'ensuit que des mutations réverses exactes de *a* vers l'allèle originel *A* sont très improbables, bien que de nombreuses mutations puissent donner lieu à des allèles qui sont *phénotypiquement* semblables à l'allèle de départ.

Message Les taux de mutation sont si faibles que la mutation à elle seule ne peut rendre compte de l'évolution rapide des populations et des espèces.

Il n'est pas possible de mesurer des taux de mutation spécifiques à un locus pour des caractères qui présentent une variation continue, mais le taux d'accumulation de la variance génétique peut être déterminé. En partant d'une lignée complètement homozygote de *Drosophila* issue d'une population naturelle, entre 1/1000 et 1/500 de la variance génétique portant sur le nombre de soies dans la population de départ est rétablie à chaque génération par mutation spontanée.

La variation due à la recombinaison

La recombinaison produit de la variance génétique bien plus rapidement que la mutation. Lorsque deux chromosomes de *Drosophila* caractérisés par une survie «normale», issus d'une population naturelle de *Drosophila*, sont autorisés à se recombiner le temps d'une génération, ils produisent une gamme de chromosomes qui possèdent de 25 à 75 pour cent de variance génétique pour la survie de plus que la population de départ. Ceci résulte simplement du fait qu'une paire de chromosomes homologues, hétérozygote pour n loci (ne tenons compte que des crossing-over simples et doubles) peut produire n $(n\text{-}1)/2$ nouveaux types de gamètes au cours d'une génération de recombinaison. Si les loci hétérozygotes sont bien espacés sur les chromosomes, ces nouveaux types de gamètes seront fréquents et une variance génétique considérable sera engendrée. Des organismes asexués ou des organismes comme les bactéries qui ne pratiquent que très rarement la recombinaison sexuée ne possèdent donc pas cette source de variation, de sorte que les mutations nouvelles représentent la seule manière de modifier les combinaisons de gènes. Il en découle que les organismes asexués pourraient évoluer plus lentement sous l'effet de la sélection naturelle que les organismes sexués.

La variation due à la migration

Une source supplémentaire de variation est constituée par la migration dans une population d'allèles provenant d'autres populations à fréquences de gènes différentes. Si p_t est la fréquence d'un allèle dans la population réceptrice à la génération t, et P est la fréquence allélique moyenne pour toutes les populations donneuses et m la proportion de migrants, la fréquence génique à la génération suivante résulte du mélange des $(1 - m)$ gènes de la population réceptrice avec m gènes des populations donneuses. Donc

$$p_{t\text{-}1} = (1\text{-}m)p_t + mP = p_t + m(P\text{-}p_t)$$

et

$$\Delta_p = p_{t\text{-}1} - p_t = m(P\text{-}p_t)$$

La modification de la fréquence génique est proportionnelle à la différence de fréquence entre la population réceptrice et la moyenne des populations donneuses. Contrairement au taux de mutation, le taux de migration (m) peut être élevé, de sorte que les modifications de fréquence peuvent être importantes.

Nous devons comprendre la *migration* comme représentant toute forme d'introduction de gènes d'une population dans une autre. Par exemple, des gènes d'Européens ont «migré» continuellement dans la population d'origine africaine depuis l'introduction en Amérique du Nord d'Africains comme esclaves. Nous pouvons déterminer le niveau de cette migration en suivant la fréquence d'un allèle trouvé exclusivement chez les Européens et non chez les Africains et la comparer à la fréquence trouvée au sein des Noirs d'Amérique du Nord.

Nous pouvons utiliser la formule pour calculer la modification de fréquence génique due à la migration si nous la modifions légèrement pour tenir compte de ce que l'immigration s'est déroulée pendant plusieurs générations. Si le taux d'immigration n'a pas été trop élevé, la somme des taux d'immigration pour une seule génération, étendue à plusieurs générations (appelons-la M), sera liée au changement total dans la population réceptrice après plusieurs générations par la même expression que celle utilisée pour des modifications dues à la migration. Si, comme précédemment, P est la fréquence allélique dans la population de donneurs, et p_0 la fréquence parmi les récepteurs, alors

$$\Delta p_{\text{total}} = M(P - p_0)$$

et

$$M = \Delta p_{\text{total}} / P - p_0$$

Par exemple, l'allèle Fy^a du groupe sanguin Duffy est absent en Afrique mais présente une fréquence de 0,42 chez les blancs de l'Etat de Géorgie. Parmi les Noirs de Géorgie, la fréquence de Fy^a est de 0,046. Donc, la migration totale de gènes de Blancs vers la population noire depuis l'introduction des esclaves au dix-huitième siècle est de

$$M = \frac{\Delta p_{\text{total}}}{P - p} = \frac{0{,}046 - 0}{0{,}42 - 0} = 0{,}1095$$

Lorsque la même analyse est menée pour des Américains noirs d'Oakland (Californie) et de Détroit, M atteint respectivement les valeurs de 0,22 et 0,26, mettant en évidence soit une plus forte immigration dans ces villes qu'en Géorgie soit des arrivées plus importantes qu'ailleurs d'Américains noirs ayant une ascendance européenne plus forte. De toute manière, la variation génétique au locus *Fy* s'est accrue du fait de cette immigration.

L'origine de nouvelles fonctions

Les mutations ponctuelles ou les remaniements chromosomiques ne représentent qu'une source limitée de variation pour l'évolution en ce sens qu'ils ne peuvent que modifier une fonction ou changer un type de fonction en un autre. L'acquisition de fonctions complètement nouvelles exige l'extension du répertoire de gènes par duplication et polyploïdie, suivie d'une divergence entre gènes dupliqués, probablement par mutation. L'extension du génome par polyploïdie s'est produite fréquemment, du moins chez les plantes. La figure 26-10 donne la distribution des fréquences du nombre haploïde de chromosomes caractérisant les espèces de plantes appartenant au groupe des Dicotylédones. Remarquez que les nombres pairs sont bien plus communs que les nombres impairs — une conséquence de l'occurrence fréquente de polyploïdes.

Une fois qu'une extension de l'ADN total du génome a eu lieu, quelques substitutions de bases dans un gène peuvent suffire à donner lieu à une nouvelle fonction. Par exemple, B. Hall a réussi expérimentalement à faire exprimer une nouvelle fonction par un gène d'*Escherichia coli*. Outre le gène *lac Z* contrôlant l'activité β-galactosidasique impliquée dans la fermentation du lactose chez *E. coli*, un autre gène de structure *ebg* code pour une β-galactosidase qui ne fermente pas le lactose quoiqu'elle soit induite par ce substrat. La fonction naturelle de cet enzyme est inconnue. Hall a pu modifier ce gène en un autre, codant pour un enzyme apte à fermenter le lactobionate. Ce résultat est dû à la modification du site de régulation provoquant l'expression constitutive et à la production de trois mutations successives dans le gène de structure.

Message L'évolution s'éteindrait d'elle-même par épuisement de la variation si une variation génétique nouvelle n'était pas créée au sein des populations par mutation, recombinaison et migration. En fin de compte, toute nouvelle variation provient des mutations géniques et chromosomiques.

Les croisements consanguins et les unions assorties

Les unions au hasard ou panmixie par rapport à un locus sont très répandues, mais ce phénomène n'est certainement pas universel. On peut distinguer deux façons de s'écarter de la panmixie. Premièrement, des conjoints peuvent ne pas s'associer au hasard soit en raison de leur degré de parenté soit de leur degré de relation génétique. Si les unions entre individus apparentés se produisent plus communément que sur une base purement fortuite, on dira que la population pratique l'**endogamie**, ou encore la **consanguinité**. Si par contre les unions entre individus apparentés sont moins fréquentes que celles qui se produiraient fortuitement, la population se caractérise par un système d'**exogamie.**

Deuxièmement, des individus peuvent avoir tendance à s'apparier, non pas en fonction de leur degré de relation génétique mais à cause de leur niveau de ressemblance pour un locus donné. Le penchant vers des unions entre individus semblables se dénomme **homogamie**. Des unions entre individus non-semblables représentent des cas d'**hétérogamie**. Le type d'assortiment n'est jamais sélectif.

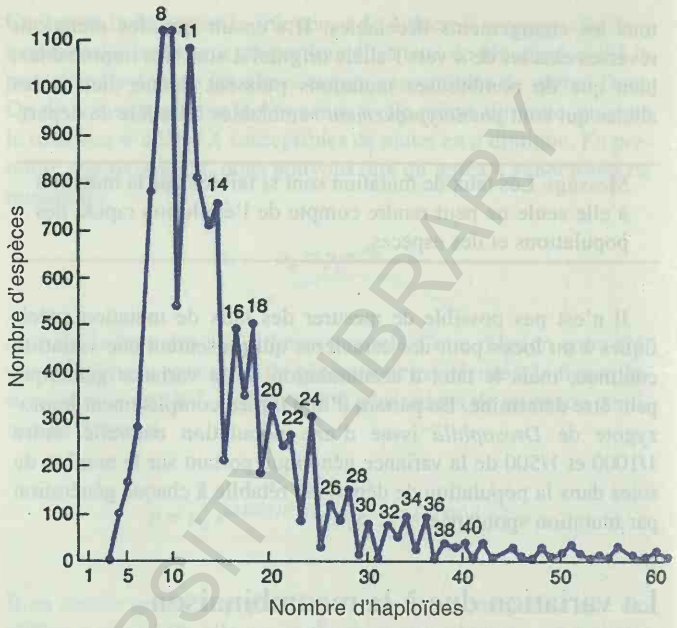


Figure 26-10. Distribution de fréquences des nombres haploïdes de chromosomes chez les Dicotylédones. (Issu de Verne Grant, *The Origin of Adaptation*, Copyright 1963 par Columbia University Press.)

Les croisements consanguins se différencient donc des unions assorties. Des individus étroitement apparentés se ressemblent plus en moyenne que des individus non-apparentés, mais pas nécessairement pour n'importe quel caractère chez des individus particuliers. Ainsi, la consanguinité peut donner lieu à des mariages d'individus très dissemblables. D'autre part, des individus qui se ressemblent par certains caractères peuvent l'être parce qu'apparentés, mais des individus non-apparentés peuvent présenter des ressemblances spécifiques. Frères et soeurs n'ont pas tous des yeux de même couleur et les individus aux yeux bleus ne sont pas du tout apparentés les uns aux autres.

Les taux d'endogamie dans les populations naturelles sont une conséquence de la distribution géographique, des mécanismes de reproduction et des caractéristiques de comportement. Si des parents proches occupent des territoires adjacents, la proximité peut entraîner l'endogamie. Les graines de nombreuses plantes, par exemple, se répartissent très près de la source parentale et le pollen n'est pas répandu à longue distance, de telle sorte qu'une fréquence élevée de croisements entre individus apparentés est observée. Certaines plantes (comme le maïs) peuvent être à la fois autogames et allogames, de telle sorte que la pollinisation par le vent entraîne une autogamie très poussée. D'autres plantes encore, comme l'arachide, sont des autogames obligatoires. De nombreux petits mammifères vivent et se reproduisent au sein de groupes familiaux restreints qui persistent génération après génération. L'homme, par contre, a généralement des tabous sexuels complexes et des interdits qui réduisent fortement l'endogamie.

Les unions assorties pour certains caractères sont très communes. Chez l'homme, il y a une nette tendance à l'homogamie pour la couleur de la peau et pour la taille, par exemple. Une dif-

UCLA ENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

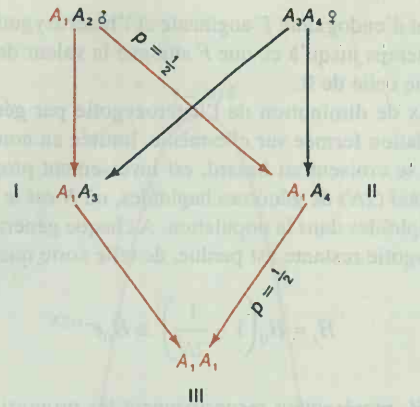


Figure 26-11. Calcul de l'homozygotie dans la descendance (III) d'un croisement frère-soeur (I-II). La probabilité que II hérite A_1 de son père est de 1/2 ; dans ce cas, la probabilité que II transmette A_1 à la génération conduisant à III est de 1/2. Donc, la probabilité que III héritera A_1 de II est de 1/2 × 1/2 = 1/4.

férence importante existe entre l'homogamie et l'endogamie : la première concerne un caractère particulier alors que la seconde concerne le génome entier. Des individus peuvent former des unions assorties en ce qui concerne la taille, mais s'unir au hasard par rapport aux groupes sanguins. Des cousins, par contre, présentent une ressemblance génétique de même degré pour tous les loci.

Tant l'homogamie que l'endogamie contribuent toutes deux à augmenter l'homozygotie au delà du niveau prédit par l'équilibre de Hardy-Weinberg. Si deux individus sont apparentés, ils ont au moins un ancêtre commun. Donc, il existe une certaine chance qu'un de leurs allèles soit issu de la même molécule d'ADN. Il en résulte une chance supplémentaire d'**homozygotie par filiation** à ajouter à la chance d'homozygotie ($p^2 + q^2$) due à l'union au hasard d'individus non-apparentés. La probabilité d'homozygotie par filiation est appelée le **coefficient de consanguinité ou coefficient d'endogamie (F)**. La figure 26-11 illustre le calcul de cette probabilité d'homozygotie par filiation. La relation entre les individus I et II est de type frère-soeur puisqu'ils sont issus du même couple de parents. Nous marquons chaque allèle chez les parents, de façon à les suivre dans la descendance. Les individus I et II s'apparient pour donner lieu à l'individu III. Si l'individu I est A_1A_3 et que le gamète qu'il transmet à III contient l'allèle A_1, nous aimerions calculer la probabilité que le gamète issu de II contienne aussi A_1. La chance est de 1/2 que II reçoive A_1 de son père, et si c'est le cas, la chance est à nouveau d'1/2 que II transmette A_1 lors de la formation du gamète en question. Donc, la probabilité que III reçoive A_1 de II équivaut à 1/2 × 1/2 = 1/4. Ceci est aussi la chance que III - le produit d'un croisement frère-soeur - soit homozygote par filiation.

Une consanguinité aussi forte peut avoir des conséquences désavantageuses. Considérons le cas d'un allèle rare et désavantageux qui, à l'état homozygote, provoque une maladie métabolique. Si la fréquence de l'allèle dans la population est de p, la probabilité qu'un couple formé au hasard produise une descendance homozygote n'est que de p^2 (selon l'équilibre de Hardy-Weinberg). Donc, si p = 1/1000, la fréquence des homozygotes sera de 1 sur 1.000.000. Supposons à présent qu'il s'agisse d'un couple frère-soeur. Si l'un de leurs parents est hétérozygote pour la maladie, ils pourraient tous deux la recevoir et la transmettre à leur descendance. La probabilité d'une descendance homozygote *aa* est en fait le produit de la probabilité que l'un ou l'autre grand-parent soit de type *Aa*

× la probabilité que *a* soit transmis au frère

× la probabilité que *a* soit transmis à la soeur

× la probabilité d'une descendance homozygote *aa* provenant de *Aa* × *Aa*

$$= (2pq + 2pq) \times 1/2 \times 1/2 \times 1/4$$

$$= \frac{pq}{4}$$

Nous considérons que la chance que les deux grand-parents soient tous deux *Aa* est négligeable. Si p est très petit, q vaut presque 1,0 et la chance d'une descendance atteinte de la maladie est proche de $p/4$. Pour p = 1/1000, ceci signifie un enfant atteint sur 4.000, comparée à celle de un sur un million dans le cas d'unions au hasard. En général, pour des couples frères-soeurs, le rapport des risques sera

$$\frac{p/4}{p^2} = \frac{1}{4p}$$

de sorte que plus le gène est rare, plus s'aggrave le risque *relatif* d'une descendance tarée suite à la consanguinité. Pour des individus apparentés de façon plus lointaine, le risque d'homozygotie par filiation décroît mais demeure cependant substantiel. Pour des cousins au premier degré, la probabilité relative est de 1/16p par rapport aux unions au hasard.

Les conséquences de la consanguinité sur la population dépendent de son degré et de sa nature. Nous en considérons dans la suite quelques exemples. En génétique expérimentale (spécialement en amélioration des plantes et en élevage), l'appariement systématique, génération après génération (par autofécondation, croisement frère-soeur et parents-enfants, ou toute autre forme de croisements entre individus apparentés), peut être utilisé pour augmenter l'homozygotie. De tels systèmes de croisements, basés sur des individus de parenté étroite peut éventuellement aboutir à l'homozygotie complète de la population, mais toutefois à des degrés différents. En nous référant au tableau 27-2, au chapitre suivant, nous pouvons nous rendre compte du niveau d'hétérozygotie encore présent au sein des lignées après de nombreuses générations de consanguinité. La fixation d'un allèle donné dans une lignée est une question de hasard. Si dans la population au sein de laquelle ont été prélevées les lignées pures, l'allèle *A* a la fréquence p et l'allèle *a* la fréquence $q = 1\text{-}p$, une proportion p des lignées homozygotes dues à l'endogamie sera homozygote *AA* et une proportion q des lignées sera *aa*. Ce que réalise la consanguinité est de convertir la variation génétique présente *au sein* de la population originale en une variation *entre* lignées homozygotes prélevées dans la population (figure 26-12).

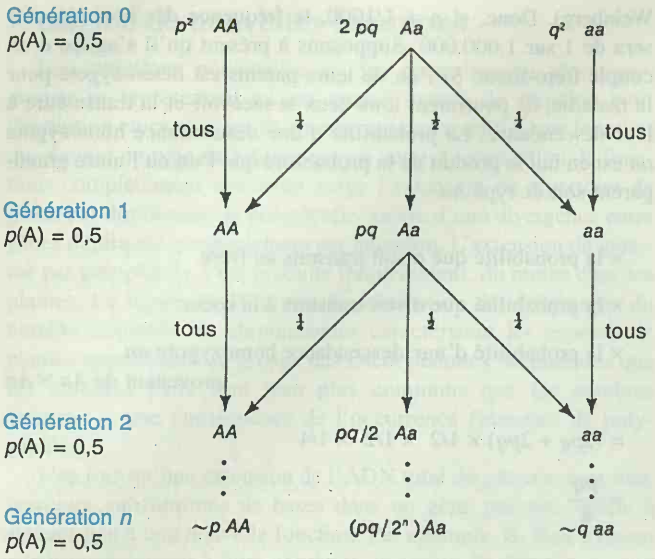


Figure 26-12. Des générations successives d'autofécondation (ou de croisements consanguins) conduisent à scinder une population hétérozygote en une série de lignées complètement homozygotes. La fréquence des lignées *AA* parmi les lignées homozygotes sera égale à la fréquence de l'allèle *A* dans la population hétérozygote originelle.

Dans une population naturelle, une fraction des croisements se réalisera entre individus apparentés (ou même par autofécondation, le cas échéant) du fait de la proximité dans l'espace. Cependant, il n'y a pas de continuité dans l'endogamie au sein d'une famille particulière. Si une certaine proportion de plantes pollinisées par le vent sont autofécondées au cours d'une génération donnée, elles ne sont pas nécessairement les descendantes des plantes autofécondées à la génération précédente; elles se distribuent au hasard entre descendants autofécondés ou issus de croisements. Une telle endogamie fortuite aboutit à l'établissement d'un équilibre des fréquences d'homozygotes et d'hétérozygotes semblable à celui de Hardy-Weinberg, mais comportant davantage d'homozygotes. Donc, la variation génétique est préservée, contrairement à ce qui se produit lors de la consanguinité expérimentale systématique.

Supposons qu'une population soit établie à partir d'un petit nombre d'individus s'appariant au hasard. Supposons aussi qu'aucune migration nouvelle ne se produise jamais dans la population. (Par exemple, les lapins actuellement présents en Australie, descendent probablement de l'introduction de quelques animaux au dix-neuvième siècle). Dans les générations ultérieures, chacun est apparenté à chacun, puisque les arbres généalogiques possèdent des ancêtres communs. Une telle population est donc consanguine, en ce sens qu'il existe une certaine probabilité qu'un gène soit homozygote par filiation. Puisque la population est, par nécessité, limitée en taille, quelques-unes des lignées introduites s'éteindront à chaque génération, exactement comme des noms de famille disparaissent dans une population humaine fermée sur elle-même parce que, par hasard, aucun descendant mâle porteur de ces noms ne survit. Si les lignées originales disparaissent, la population tend à comporter de moins en moins d'individus fondateurs, et il devient de plus en plus probable que tous les membres de la population portent les mêmes allèles par filiation. En d'autres termes, le coefficient d'endogamie F augmente et l'hétérozygotie diminue au cours du temps jusqu'à ce que F atteigne la valeur de 1,00 et l'hétérozygotie celle de 0.

Le taux de diminution de l'hétérozygotie par génération dans une population fermée sur elle-même, limitée en nombre et où les individus se croisent au hasard, est inversement proportionnel au nombre total ($2N$) de génomes haploïdes, où N est le nombre d'individus diploïdes dans la population. A chaque génération, $1/2N$ de l'hétérozygotie restante est perdue, de telle sorte que

$$H_t = H_0\left(1 - \frac{1}{2N}\right)^t \cong H_0 e^{-t/2N}$$

où H_t et H_0 représentent respectivement les proportions d'hétérozygotes dans la $t^{\text{ième}}$ génération et dans la génération de départ. Quand le nombre t de générations devient important, H_t approche de zéro.

La fixation à un locus d'un allèle déterminé est une question de hasard. Si l'allèle A_i a une fréquence p_i dans la population de départ, la probabilité que la population devienne finalement homozygote A_iA_i est de p_i. Supposons qu'un certain nombre de populations insulaires isolées soient fondé au départ d'une vaste population hétérozygote. Finalement, si ces populations isolées demeurent complètement séparées les unes des autres, chacune d'elles deviendra homozygote pour l'un des allèles de chaque locus. Certaines seront homozygotes A_1A_1, certaines A_2A_2, et ainsi de suite. Donc, cette forme d'endogamie aboutit à la différenciation génétique des populations.

Message Nous nous apercevons, une fois de plus, que l'endogamie est un processus qui convertit la variation génétique au sein de la population en différences entre populations en rendant chaque population isolée homozygote pour un allèle déterminé au hasard.

Au sein de chaque population, un changement de fréquence allélique se produit, à partir du p_i de départ soit vers 1 soit vers 0, selon l'allèle qui est fixé, mais la fréquence allélique moyenne dans l'ensemble de telles populations demeure p_i. La Figure 26-13 donne la distribution des fréquences alléliques au sein des populations isolées au cours de générations successives, avec $p(A_1) = 0{,}5$. A la génération 0, toutes les populations sont identiques. Au cours du temps, les fréquences géniques parmi les populations divergent et certaines se fixent. Après environ $2N$ générations, toutes les fréquences alléliques ont la même probabilité sauf les classes fixées ($p = 0$ et $p = 1$), et environ la moitié des populations sont totalement homozygotes. Après $4N$ générations, 80 pour cent des populations sont fixées, une moitié étant homozygote *AA* et l'autre moitié étant homozygote *aa*.

Le processus de différenciation par endogamie au sein de populations isolées est sans doute lent, mais pas à l'échelle de l'évolution ou des temps géologiques. Si une île peut contenir, disons 10.000 rongeurs d'une espèce, après 20.000 générations (environ 7.000 ans en supposant trois générations par an), la population sera homozygote pour environ la moitié de tous les loci qui étaient initialement à leur maximum d'hétérozygotie. En outre, cette population insulaire se différenciera d'autres populations similaires de deux manières. De nombreuses autres populations seront encore en train de ségréger pour des loci qui sont déjà fixés dans celle que nous venons de considérer et d'autres populations seront fixées pour d'autres allèles encore. Pour les loci qui continuent de ségré-

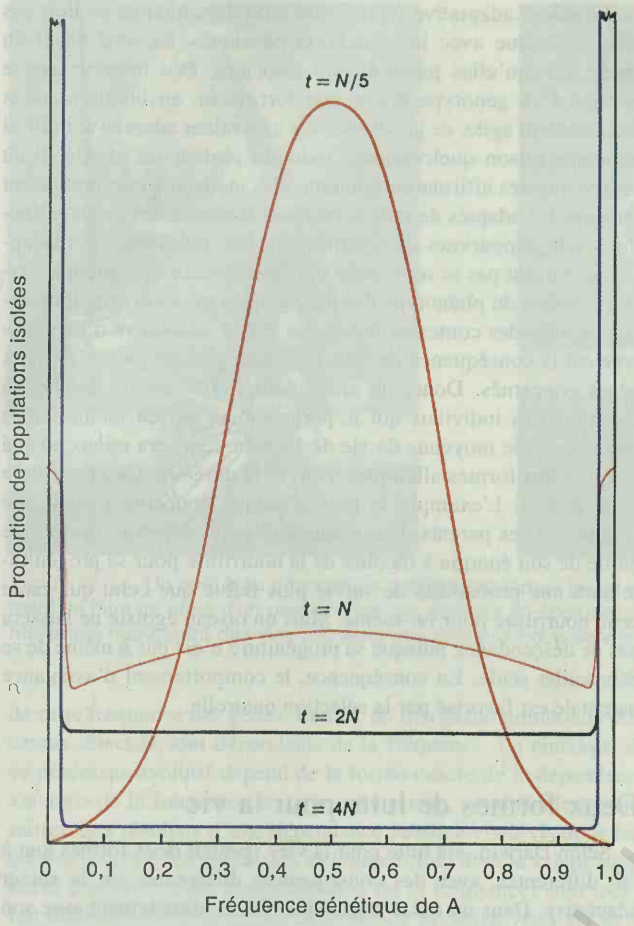


Figure 26-13. Distribution des fréquences géniques parmi des populations isolées depuis de nombreuses générations. Le nombre de générations écoulées (*t*) est donné en multiples de la taille de la population (*N*).

ger dans toutes les populations, la variance de la fréquence génique d'une population à l'autre sera importante, comme le montre la figure 26-13.

L'équilibre entre l'endogamie et la variation nouvellement introduite

Chaque population de chaque espèce est limitée en taille, de sorte que toutes les populations devraient finalement devenir homozygotes et différenciées les unes des autres suite à la consanguinité. L'évolution devrait ainsi s'arrêter. Dans la nature cependant, de nouvelles variations sont constamment introduites dans les populations par mutation et par migration. On peut en déduire que la variation réellement disponible pour la sélection naturelle résulte d'un équilibre entre d'une part, l'introduction d'une variation nouvelle et, d'autre part, sa perte par endogamie. Le taux de décroissance de l'hétérozygotie dans une population isolée est de $1/2N$, de sorte que toute différenciation entre populations sera annulée si de la variation nouvelle y est introduite à ce taux ou à un taux plus élevé. Soit m le taux de migration dans une population donnée et m le taux de mutation créateur de nouveaux allèles; une population maintiendra approximativement (à un ordre de grandeur près) la majorité de son hétérozygotie et ne se différenciera pas considérablement d'autre populations par consanguinité si

$$m \geq \frac{1}{N} \quad \text{ou} \quad \mu \geq \frac{1}{N}$$

ou si

$$Nm \geq 1 \quad \text{ou} \quad N\mu \geq 1$$

Pour des populations de dimensions intermédiaires et même relativement grandes, il est peu probable que $N\mu \geq 1$. Par exemple, pour qu'il en soit ainsi dans une population d'environ 100.000 individus, le taux de mutation doit excéder 10^{-5}, ce qui constitue un taux élevé, bien qu'il y en ait des exemples. Par ailleurs, un taux de migration de 10^{-5} par génération n'est pas inconcevable. En fait,

$$m = \frac{\text{nombre d'immigrants}}{\text{effectif total}} = \frac{\text{nombre d'immigrants}}{N}$$

Donc, l'exigence que $N\mu \geq 1$ équivaut à l'exigence que

$$Nm = N \times \frac{\text{nombre d'immigrants}}{N} \geq 1$$

ou que

$$\text{nombre d'individus immigrants} \geq 1$$

quelle que soit la taille de la population! Dans de nombreuses populations, l'immigration de plus d'un individu par génération est tout à fait concevable. Les populations humaines (même les tribus isolées) ont un taux de migration plus élevé que cette valeur minimale. Il en résulte, que chez l'homme, par exemple, on ne connaît aucun locus pour lequel un allèle soit fixé dans certaines populations et un autre allèle fixé dans d'autres populations (voyez le tableau 26-9).

Sélection

La valeur adaptative et la lutte pour la survie

Darwin avait reconnu l'existence de deux processus évolutifs, devant tous deux être expliqués. L'un concerne l'origine de la *diversité* des organismes, le second l'origine de *l'adaptation* de ces mêmes organismes. L'évolution ne se résume pas à l'origine et à l'extinction de différentes formes organiques; c'est aussi un processus produisant une sorte d'adéquation entre les phénotypes des espèces et les environnements dans lesquels elles vivent. L'explication de Darwin de ce phénomène résidait dans l'existence d'une *lutte constante pour la survie*. Les organismes dont le phénotype est le mieux adapté à l'environnement ont une plus

BCU - IRSI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

grande probabilité de survivre à cette lutte et de laisser une descendance plus nombreuse. On peut présumer que plus un organisme a la vue développée, plus sa chance de localiser de la nourriture, de se défendre, de trouver des partenaires, etc. est grande. Darwin appela le processus de survie et de reproduction différentielle **sélection naturelle**. Il choisit ce terme par analogie avec la **sélection artificielle** menée par les éleveurs et les sélectionneurs qui choisissent délibérément certains individus pour être les parents de la génération suivante, tout en en rejetant d'autres.

La probabilité relative de survie et de reproduction d'un phénotype ou d'un génotype est appelée actuellement **valeur adaptative darwinienne**. Quoique les généticiens parlent parfois d'une façon imprécise de la valeur adaptative d'un individu, ce concept s'applique réellement à des classes d'individus et désigne clairement la survie et la reproduction moyenne des individus de cette classe. Suite à des événements fortuits, même deux organismes au génotype identique et vivant dans le même environnement, différeront par leur taux de survie et de reproduction. Aucune prédiction concernant l'évolution d'un organisme ne peut donc être basée sur l'histoire d'un seul individu. C'est la valeur adaptative moyenne d'un génotype parmi tous ceux qui le possèdent qui s'avère déterminante.

La valeur adaptative reflète en fait la relation existant entre le phénotype d'un organisme et le milieu dans lequel l'organisme se développe, de sorte qu'un même génotype présentera des valeurs adaptatives différentes dans des milieux différents. Ceci provient en partie de ce que l'exposition à différents milieux au cours du développement aboutit à des phénotypes différents au départ des mêmes génotypes. Mais, à phénotype identique, le succès de l'organisme dépendra de son milieu. La possession de pieds palmés est avantageuse pour se déplacer dans l'eau mais franchement désavantageuse pour se déplacer sur terre, comme l'observation de la marche d'un canard le révèle rapidement. Aucun génotype n'est inconditionnellement supérieur aux autres en valeur adaptative quel que soit le milieu.

En outre, le milieu n'est pas une donnée figée que l'organisme subit passivement. Le milieu d'un organisme se définit en fonction des activités de l'organisme lui-même. Les étendues d'herbes sèches font partie de l'environnement du junco (un bruant d'Amérique du Nord), de sorte que les oiseaux qui sont les plus efficaces dans le ramassage perdront moins d'énergie à la construction de nids et auront une valeur adaptative plus élevée. Mais les herbes sèches font partie du milieu du junco *parce que ces oiseaux les prélèvent pour faire leur nid*. Les rochers associés à la prairie herbeuse ne font pas partie du milieu du junco, quoiqu'ils y soient physiquement présents. Par contre, les rochers font partie du milieu des grives; ces oiseaux utilisent les rochers pour casser les coquilles d'escargots. En plus, le milieu qui se définit par les activités liées à la vie d'un organisme donné évolue en fonction de ces activités. La structure du sol qui détermine en partie les types de plantes qui s'y développent est elle-même modifiée par la croissance de ces mêmes plantes. Les organismes définissent et modifient à la fois leur milieu. Donc, lorsqu'ils évoluent en réponse à leur milieu, ils se retrouvent eux-mêmes dans des milieux nouveaux qui sont le produit direct de leur propre évolution. Lorsque les plantes primitives développèrent une activité photosynthétique, elles modifièrent l'atmosphère terrestre de sorte que d'une situation sans oxygène libre et à concentration élevée de dioxyde de carbone, nous sommes passés à l'atmosphère actuelle, qui contient 21 pour cent d'oxygène et seulement 0,03 pour cent de dioxyde de carbone. Les plantes qui se développent aujourd'hui le font dans un milieu façonné par l'évolution de leurs propres ancêtres.

La valeur adaptative reproductrice ou darwinienne ne doit pas être confondue avec la «condition physique» au sens banal du terme, quoiqu'elles puissent être associées. Peu importe que le porteur d'un génotype donné soit fort, beau, en bonne santé et mentalement agile, ce génotype aura une valeur adaptative nulle si pour une raison quelconque, l'individu porteur est stérile. Il en résulte que des affirmations comme «les inadaptés se reproduisent plus que les adaptés de telle sorte que l'espèce court à son extinction» sont dépourvues de signification. Par définition, les inadaptés ne peuvent pas se reproduire plus que les adaptés, quoique certains aspects du phénotype des plus adaptés puissent être désavantageux dans des contextes précis. La valeur adaptative d'un génotype est la conséquence de tous les effets phénotypiques dus aux gènes concernés. Donc, un allèle dont l'effet est de doubler la fécondité des individus qui le portent mais qui en même temps réduit la durée moyenne de vie de 10 pour cent sera mieux adapté que d'autres formes alléliques, malgré la durée de vie plus courte qu'il permet. L'exemple le plus classique concerne l'assistance fournie par les parents. Un oiseau adulte qui dépense une grande partie de son énergie à récolter de la nourriture pour sa progéniture aura une probabilité de survie plus faible que celui qui garde cette nourriture pour lui-même. Mais un oiseau égoïste ne laissera pas de descendance puisque sa progéniture n'est pas à même de se débrouiller seule. En conséquence, le comportement d'assistance parentale est favorisé par la sélection naturelle.

Deux formes de lutte pour la vie

Selon Darwin, «la lutte pour la vie» revêtait deux formes tout à fait différentes, avec des conséquences différentes sur la valeur adaptative. Dans un cas, l'organisme «lutte» directement avec son milieu. L'exemple de Darwin a trait à la plante luttant pour l'eau à la limite du désert. La valeur adaptative d'un génotype, dans ce cas, ne dépend pas du fait qu'il est répandu ou rare dans la population, puisque la valeur adaptative n'est pas due aux interactions entre individus mais bien la conséquence directe de la relation physique de l'individu avec son environnement. La valeur adaptative est alors **indépendante de la fréquence du génotype**.

L'autre forme de lutte se déroule entre organismes en compétition pour une ressource rare ou qui interagissent de telle sorte que leurs abondances relatives déterminent leur valeur adaptative. Un exemple concerne le mimétisme chez les papillons. Certaines espèces de papillons (comme le monarque et le vive-roi) sont désagréables au goût pour les oiseaux, lesquels, après quelques essais, apprennent à s'abstenir d'attaquer de tels papillons. Si deux espèces diffèrent dans leur dessin, la sélection s'eventuera à les rendre plus similaires (figure 26 - 14) puisque toutes deux sont protégées et souffrent de façon similaire durant la période d'apprentissage des oiseaux. Le dessin le moins fréquent sera désavantagé par rapport au plus fréquent puisque les oiseaux apprendront moins souvent à les éviter. Au sein d'une espèce, les dessins rares seront contre-sélectionnés pour la même raison. Au moins fréquent le dessin, au plus le désavantage sélectif joue, puisque les oiseaux n'auront pas vraisemblablement eu une expérience préalable d'un tel dessin peu représenté et donc ne l'éviteront pas. Cette sélection en faveur de ceux qui se confondent dans la foule est un exemple de **valeur adaptive dépendant de la fréquence du génotype.**

Pour des raisons de facilité, la plupart des modèles mathématiques élaborés pour expliquer les mécanismes de sélection naturelle sont basés sur l'emploi d'une valeur adaptative indépendante

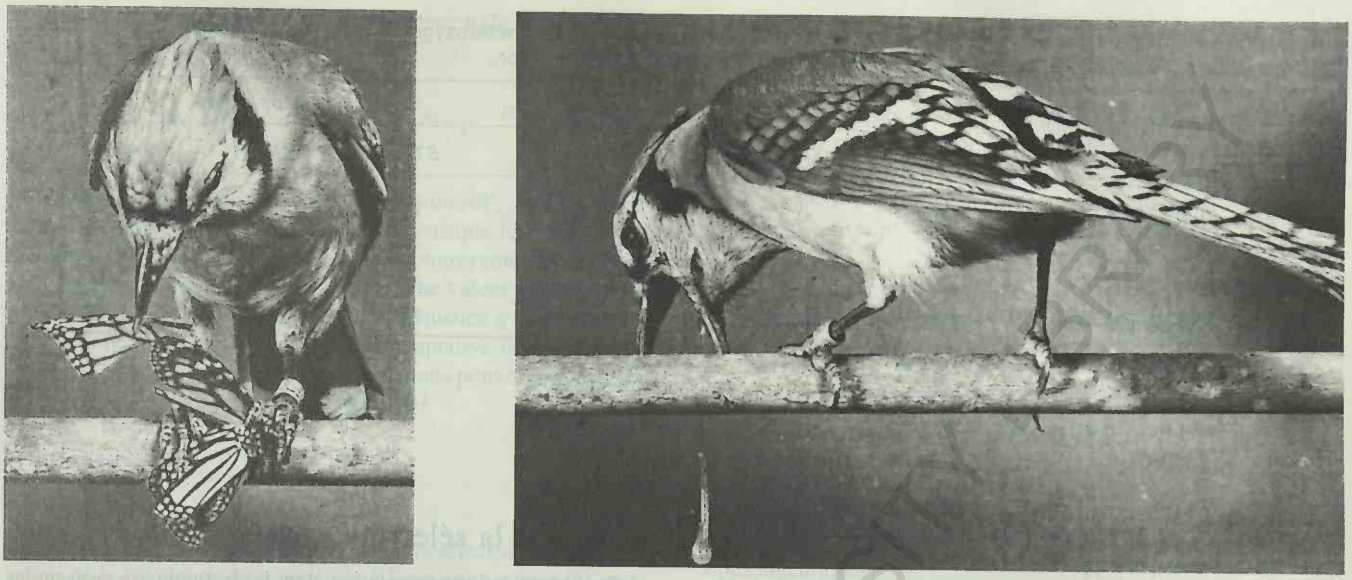


Figure 26-14. Un geai bleu dévorant un papillon monarque (a) ce qui le fait vomir (b). Après une telle expérience, le geai refusera ultérieurement de faire sa proie d'un papillon vice-roi, similaire en apparence au monarque, quoique des geais n'ayant jamais fait l'expérience du monarque mangeront des vice-rois sans que cela provoque de vomissements. (Photographies aimablement fournies par Lincoln Brower).

de cette fréquence des gènes. En fait, un très grand nombre de processus sélectifs sont dépendants de la fréquence. La cinétique de ce processus évolutif dépend de la forme exacte de la dépendance vis-à-vis de la fréquence et, pour cette raison, est difficile à généraliser. Les résultats d'une dépendance *positive* vis-à-vis de la fréquence (comme les prédateurs en compétition, dont la valeur adaptative augmente avec l'augmentation de la fréquence) sont tout à fait différents de ceux d'une dépendance *négative* vis-à-vis de la fréquence (comme le mimétisme des papillons, où la valeur adaptative d'un génotype décroît alors que sa fréquence augmente). Pour des raisons de simplicité et pour illustrer les principales caractéristiques qualitatives de la sélection, nous ne ferons usage que de modèles de sélection basés sur l'indépendance vis-à-vis de la fréquence, mais cette solution de facilité ne doit pas être confondue avec la réalité.

La mesure des différences de valeur adaptative

Généralement, les différences de valeur adaptative entre différents génotypes se mesurent plus facilement lorsque les génotypes diffèrent en de nombreux loci. Il n'y a que peu de cas (exception faite des mutants de laboratoire, variétés horticoles et maladies importantes du métabolisme) où la substitution d'un allèle à un seul locus se répercute sous la forme de différences de valeur adaptative mesurables. La figure 26-15 décrit la probabilité de survie de l'oeuf à l'adulte - c'est-à-dire, la **viabilité** - d'un certain nombre d'homozygotes pour le chromosome 2 à trois températures différentes chez *Drosophila pseudoobscura*. Comme on l'a souvent observé, la valeur adaptative (dans ce cas, la viabilité qui est une composante de l'aptitude totale) est différente d'un milieu à un autre. Quelques homozygotes sont létaux ou quasi létaux aux trois températures, alors que quelques autres présentent régulièrement une viabilité plus élevée. La plupart des génotypes, cependant, n'ont pas une viabilité uniforme d'une température à une autre, et aucun génotype n'apparaît comme le mieux adapté à toutes les températures. La valeur adaptative de ces homozygotes chromoso-

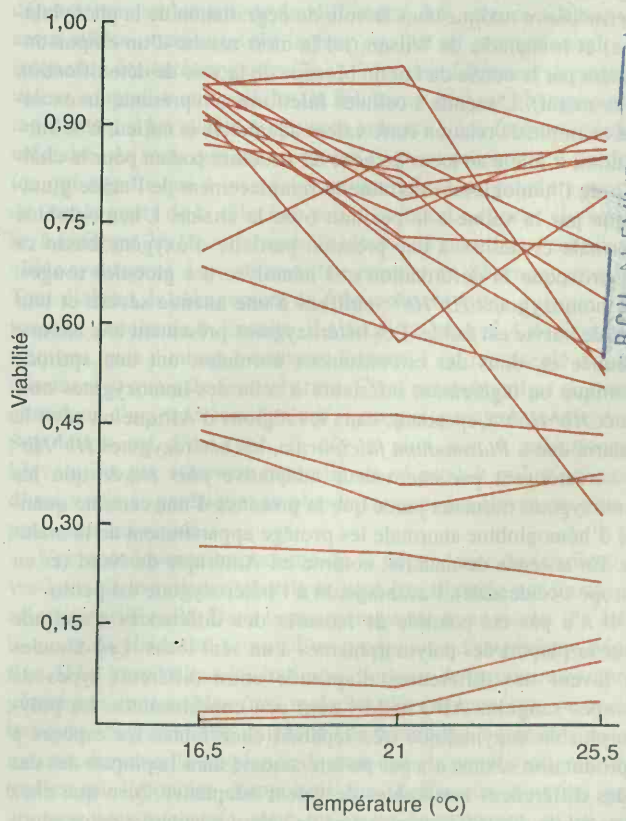


Figure 26-15. Viabilité de divers homozygotes chromosomiques chez *Drosophila pseudoobscura* à trois températures différentes.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI BIOLOGIE

Tableau 26-12. Comparaison des aptitudes pour des inversions d'homozygotes et d'hétérozygotes dans des populations de laboratoire de *Drosophila pseudoobscura*. Les mesures se font dans des situations de compétition.

	Homozygotes			Hétérozygotes		
Expérience	*ST/ST*	*AR/AR*	*CH/CH*	*ST/AR*	*ST/CH*	*AR/CH*
ST et *AR* seul	0,8	0,5	—	1,0	—	—
ST et *CH* seul	0,8	—	0,4	—	1,0	—
AR et *CH* seul	—	0,86	0,48	—	—	1,0
ST, AR, et *CH* ensemble	0,83	0,15	0,36	1,0	0,77	0,62

miques n'a pas été évaluée dans des conditions de compétition : elle a été mesurée par rapport à une référence commune, de telle sorte que nous ne savons pas si elle dépend de la fréquence. Un exemple de valeur adaptative dépendant de la fréquence est donné par les estimations établies pour des homozygotes et des hétérozygotes d'inversion chez *Drosophila pseudoobscura* au tableau 26-12.

Les «maladies congénitales du métabolisme» fournissent l'exemple de différences marquées de valeur adaptative résultant de la substitution d'un seul gène : un allèle récessif perturbe une voie métabolique et entraîne la mortalité des homozygotes. Deux cas peuvent être cités chez l'homme : la phénylcétonurie (où une dégénérescence tissulaire résulte de l'accumulation d'un produit intermédiaire toxique dans la voie de dégradation de la phénylalanine) et la maladie de Wilson (ici la mort résulte d'un empoisonnement par le cuivre du fait du blocage de la voie de détoxification de ce métal). L'anémie à cellules falciformes représente un excellent exemple de relation entre valeur adaptative et milieu. Une substitution d'allèle au locus du gène de structure codant pour la chaîne *b* de l'hémoglobine entraîne le remplacement de l'acide glutamique par la valine à la position 6 de la chaîne. L'hémoglobine anormale cristallise à une pression partielle d'oxygène basse ce qui provoque la déformation et l'hémolyse des globules rouges. Les homozygotes Hb^SHb^S souffrent d'une anémie sévère et leur taux de survie est faible. Les hétérozygotes présentent une anémie atténuée et, dans des circonstances normales, ont une aptitude identique ou légèrement inférieure à celle des homozygotes normaux Hb^AHb^A. Cependant, dans les régions d'Afrique où sévit la malaria due à *Plasmodium falciparum*, les hétérozygotes Hb^AHb^S se caractérisent par une valeur adaptative *plus élevée* que les homozygotes normaux parce que la présence d'une certaine quantité d'hémoglobine anormale les protège apparemment de la malaria. En absence de malaria, comme en Amérique du Nord (et en Europe occidentale), l'avantage du à l'hétérozygotie est perdu.

Il n'a pas été possible de mesurer des différences d'aptitude pour la plupart des polymorphismes à un seul locus. Les données en faveur des différences d'aptitude entre différents types de groupes sanguins ABO et MN sont peu convaincantes. Le polymorphisme enzymatique très répandu chez toutes les espèces à reproduction sexuée n'a pas pu être associé dans la plupart des cas à des différences mesurables de valeur adaptative, bien que chez *Drosophila* des différences nettes de valeur adaptative entre génotypes aient été démontrées en laboratoire pour quelques loci comme l'α-amylase et la déshydrogénase alcoolique.

Comment la sélection s'exerce-t-elle ?

Supposons qu'une population, dont les individus se croisent au hasard pour un locus à deux allèles, possède un effectif si grand que (pour l'instant) nous puissions faire fi de la consanguinité. Aussitôt après la fertilisation des oeufs, les zygotes seront répartis selon l'équilibre d'Hardy-Weinberg :

Génotype	*AA*	*Aa*	*aa*
Fréquence	p^2	$2pq$	q^2

et $p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1{,}0$, avec p = fréquence de *A*.

Supposons en outre que les trois génotypes aient une probabilité de survie jusqu'à l'âge adulte (viabilité) de $W_{AA} : W_{Aa} : W_{aa}$. Parmi la descendance ayant atteint l'âge adulte, les fréquences seront

Génotype	*AA*	*Aa*	*aa*
Fréquence	p^2W_{AA}	$2pq\,W_{Aa}$	q^2W_{aa}

Ces fréquences ajustées ne donnent pas une somme égale à l'unité puisque les W représentent tous des fractions inférieures à 1. Cependant, nous pouvons les ajuster de sorte que ce soit le cas, sans modifier leur rapport, en divisant chaque fréquence par la somme des fréquences après sélection ($\overline{W}$) :

$$\overline{W} = p^2W_{AA} + 2pqW_{Aa} + q^2W_{aa}$$

Ainsi définie, $\overline{W}$ est dénommée la **valeur adaptative moyenne** de la population puisqu'elle est en fait la moyenne des valeurs adaptatives de tous les individus de la population. Suite à cet ajustement, nous obtenons

Génotype	*AA*	*Aa*	*aa*
Fréquence	$p^2\frac{W_{AA}}{\overline{W}}$	$2pq\frac{W_{Aa}}{\overline{W}}$	$q^2\frac{W_{aa}}{\overline{W}}$

Nous pouvons maintenant établir la fréquence p'de l'allèle A à la génération suivante en sommant les gènes :

$$p' = AA + (1/2)Aa = p^2 = \frac{W_{AA}}{\overline{W}} + \frac{pqW_{Aa}}{\overline{W}} = p\,\frac{pW_{AA} + qW_{Aa}}{\overline{W}}$$

Finalement, nous écrivons que l'expression $pW_{AA} + qW_{Aa}$ est la valeur adaptative moyenne des allèles A, puisque les allèles A se présentent avec la fréquence p chez les homozygotes comportant un autre A, et, dans ces conditions, ont une valeur adaptative de W_{AA}, tandis qu'ils se présentent avec la fréquence q chez les hétérozygotes incluant a et avec une valeur adaptative W_{Aa}. En faisant usage de $\overline{W}_A$ pour signifier $pW_{AA} + qW_{Aa}$, nous pouvons finalement exprimer la nouvelle fréquence génique par

$$p' = p\,\frac{\overline{W}_A}{\overline{W}}$$

En d'autres termes, après une génération de sélection, la nouvelle valeur de la fréquence de A est égale à l'ancienne valeur (p) multipliée par le rapport de l'aptitude moyenne des allèles A à la valeur adaptative de l'ensemble de la population. Si la valeur adaptative des allèles A est plus grande que la valeur adaptative moyenne de tous les allèles, $\overline{W}_A/\overline{W}$ est supérieur à l'unité et p'plus grand que p. Dans ce cas, la fréquence de l'allèle A augmente dans la population. Inversement, si $\overline{W}_A/\overline{W}$ est inférieur à l'unité, la fréquence de A décroît. Mais la valeur adaptative moyenne de la population ($\overline{W}$) est la valeur adaptative moyenne des allèles A et des allèles a. Donc, si $\overline{W}_A$ est plus grande que la valeur adaptative moyenne de la population, elle doit être plus élevée que $\overline{W}_a$, la valeur adaptative moyenne des allèles a.

Message L'allèle caractérisé par la valeur adaptative moyenne la plus élevée voit sa fréquence augmenter dans la population.

Il faut noter que les valeurs adaptatives W_{AA}, W_{Aa} et W_{aa} peuvent être exprimées soit comme des probabilités de survie et des taux de reproduction absolus, soit réévaluées par rapport à l'une des valeurs adaptatives, à laquelle on donne la valeur standard de 1,0. Cette opération n'a aucun effet sur la formule permettant de calculer p' puisqu'elle s'élimine en étant présente au numérateur et au dénominateur.

Message Le cours de la sélection ne dépend que des aptitudes relatives.

Une augmentation de la fréquence de l'allèle dont la valeur adaptative est la plus élevée signifie que la valeur adaptative moyenne de la population entière s'accroît, de telle sorte que la sélection peut être décrite comme un processus *augmentant la valeur adaptative moyenne*. Cette règle n'est rigoureusement vraie que dans le cas de valeurs adaptatives génotypiques indépendantes de la fréquence, mais elle est suffisamment générale pour être très utile. La maximalisation de l'aptitude ne conduit pas nécessairement à une propriété optimale pour l'ensemble de l'espèce, parce que les valeurs adaptatives ne se définissent au sein de la population que les unes par rapport aux autres. C'est bien l'aptitude relative (et non absolue) qui est accrue par sélection. La population ne devient pas nécessairement plus grande ou ne se développe pas nécessairement plus vite, de même qu'il n'est pas moins probable qu'elle disparaisse.

Le taux de changement de la fréquence génique

Une autre façon d'aborder le processus de sélection est de considérer le changement de la fréquence allélique au cours d'une génération :

$$\Delta p = p' - p = \frac{p\overline{W}_A}{\overline{W}} - p = \frac{p(\overline{W}_A - \overline{W})}{\overline{W}}$$

Mais $\overline{W}$, la valeur adaptative moyenne de la population, est la moyenne de toutes les valeurs adaptatives $\overline{W}_A$ et $\overline{W}_a$, de sorte que

$$\overline{W} = p\overline{W}_A + q\overline{W}_a$$

En substituant cette expression de $\overline{W}$ dans la formule de Δp et en nous rappelant que $q = 1\text{-}p$, nous obtenons (après quelques conversions algébriques)

$$\Delta p = \frac{pq(\overline{W}_A - \overline{W}_a)}{\overline{W}}$$

ce qui est l'expression générale pour un changement de fréquence allélique lié à la sélection. Cette formule générale est particulièrement éclairante. Elle prédit que Δp sera positif (A augmentera) si la valeur adaptative moyenne des allèles A est plus grande que la valeur adaptative moyenne des allèles a, comme nous l'avons vu auparavant. Mais elle montre aussi que la vitesse du changement dépend non seulement de la différence des valeurs adaptatives entre allèles, mais aussi du facteur pq, qui est proportionnel à la fréquence des hétérozygotes ($2pq$). Pour une différence donnée de valeur adaptative entre allèles, la fréquence génique changera plus rapidement si les allèles A et a sont présents à une fréquence intermédiaire, de sorte que pq est grand. Si p est proche de 0 ou de 1 (ce qui signifie que A ou a est quasiment fixé), pq est alors proche de 0 et le cours de la sélection sera très lent. La courbe sigmoïdale, à la figure 26-16, représente la vitesse de sélection d'un nouvel allèle avantageux A envahissant une population d'homozygotes aa. Tout d'abord, le changement de fréquence est faible puisque p est toujours proche de 0. Ensuite, il s'accélère lorsque A devient plus fréquent, puis diminue à nouveau lorsque A est représenté majoritairement et que a devient très rare. C'est précisément ce que nous attendons d'un processus évolutif. Lorsque la majeure partie de la population est d'un type, il n'y a plus rien à sélectionner. L'évolution par sélection naturelle ne se produit qu'en présence d'une variance génétique; au plus la variance est élevée, au plus le processus est rapide.

Une conséquence importante de la dépendance de la sélection vis-à-vis de la variance génétique peut être illustrée par un cas de sélection artificielle. Dans la première partie de ce siècle, il a été à la mode de plaider en faveur d'un programme d'**eugénique négative**. Il fut proposé que les individus porteurs de certains caractères génétiques indésirables (des maladies disons nerveuses ou métaboliques) devraient être empêchés de procréer. On pensait, par ce moyen, diminuer la fréquence du trait dans la population, et éventuellement l'éliminer. Supposons que l'efficacité d'un tel programme soit totale, de sorte qu'aucun homozygote aa ne soit admis à se reproduire. Les valeurs adaptatives des génotypes sont donc :

UNIVERSITY LIBRARY

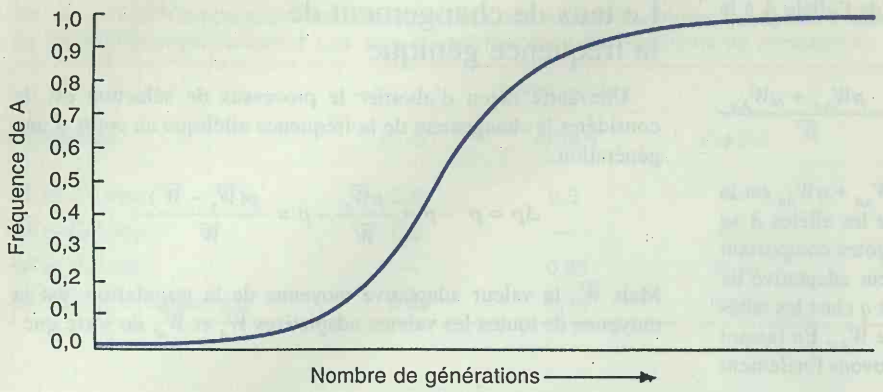


Figure 26-16. Profil dans le temps de l'augmentation de fréquence d'un nouvel allèle favorable *A* qui a pénétré dans une population d'homozygotes *aa*.

génotype	*AA*	*Aa*	*aa*
valeur adaptative	1,0	1,0	0

Si p est la fréquence de A et q la fréquence de a, il s'ensuit que

$$\overline{W}_A = pW_{AA} + qW_{Aa} = p(1) + q(1) = 1{,}0$$
$$\overline{W}_a = pW_{Aa} + qW_{aa} = p(1) + q(0) = p$$
$$\overline{W} = p^2W_{AA} + 2pqW_{Aa} + q^2W_{Aa} = p\overline{W}_A + q\overline{W}_a$$
$$= p(1) + q(p) = p(1 + q)$$

de sorte que

$$q' = q\frac{\overline{W}_a}{\overline{W}} = q\frac{p}{p(1+q)} = \frac{q}{1+q}$$

En appliquant cette formule sur plusieurs générations, nous obtiendrons

$$q'' = \frac{q'}{1+q'} = \frac{q/(1+q)}{1+q/(1+q)} = \frac{q}{1+2q}$$

$$q''' = \frac{q}{1+3q}$$

$$q^n = \frac{q}{1+nq} = \frac{1}{n+1/q}$$

De ce calcul, nous pouvons déduire l'impact d'un programme eugénique négatif. Un gène défavorable sera déjà peu représenté au départ dans la population. Supposons que q = 1/100, par exemple. Après une génération, la fréquence sera de 1/101; après deux générations, 1/102 et ainsi de suite. Cela prendrait 100 générations pour amener la fréquence à 1/200 et 200 autres générations pour la diminuer encore de moitié jusqu'à 1/400. Comme une génération humaine est de 25 ans, 2500 ans (la période écoulée depuis la fondation de la République de Rome) d'une sélection parfaitement efficace à l'encontre du caractère récessif seraient nécessaires pour réduire sa fréquence de 1/100 à 1/200. Tout plan d'eugénique négative est donc clairement impraticable.

Evidemment, si l'hétérozygote porteur du gène défavorable (comme par exemple l'anémie à cellules falciformes) pouvait être décelé, toutes les copies de ce gène pourraient être éliminées de la population en une seule génération si tous les hétérozygotes étaient empêchés de se reproduire. Le seul inconvénient de cette suggestion réside dans le fait que chaque être humain est hétérozygote pour différents gènes récessifs défavorables et que personne ne pourrait être admis à se reproduire.

Les objections à de telles mesures eugéniques ne peuvent naturellement pas se fonder sur leur impraticabilité, puisqu'il peut toujours être affirmé que certains effets génétiques sont pires que d'autres, et ce sont ceux-là qui devraient être faire l'objet d'une élimination eugénique. Le vrai problème est celui du pouvoir et des droits. Les problème d'eugénisme sont ceux du conflit entre les droits des individus et ceux de l'état, et aussi entre individus différents. Qui s'arrogerait le pouvoir de décider ce qui fait «qu'une vie ne vaut pas la peine d'être vécue» ? Et puisqu'un nouveau-né ou un foetus ne peuvent pas avoir ce pouvoir, comment serait résolu le conflit entre droits respectifs ? Outre le problème de savoir comment il *devrait être* résolu, il est encore plus crucial de savoir comment il *sera* résolu pratiquement dans notre vie sociale.

Lorsque des allèles d'un autre type ne sont pas rares, la sélection peut entraîner des changements rapides dans la fréquence allélique. A la figure 26-17, le processus d'élimination d'un allèle de la déshydrogénase malique est décrit pour une population de laboratoire de *Drosophila melanogaster*. Les valeurs adaptatives dans ce cas sont

$$W_{AA} = 1{,}0 \qquad W_{Aa} = 0{,}75 \qquad W_{aa} = 0{,}40$$

Naturellement, la fréquence de a ne se réduit pas à 0, et une diminution ultérieure de la fréquence exigera des temps de plus en plus longs, comme dans le cas de l'eugénique négative.

Message A moins que des allèles d'un autre type ne soient présents à des fréquences intermédiaires, la sélection (spécialement contre les formes récessives) est très lente. La sélection dépend de la variation génétique.

Polymorphisme équilibré

Réexaminons la formule générale du changement de fréquence allélique (page 801) :

POLK SIV CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

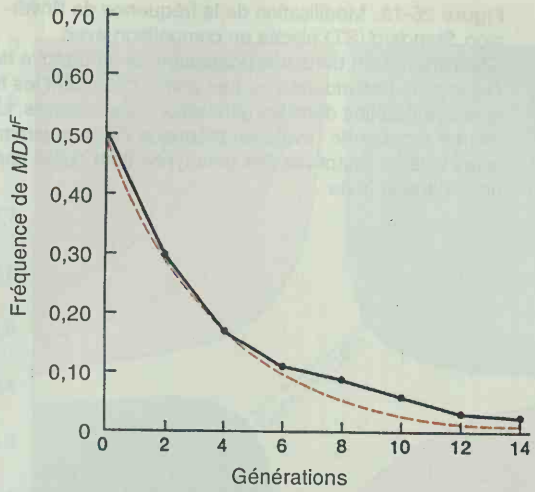


Figure 26-17. Perte d'un allèle du locus de la déshydrogénase malique (MDH^F) suite à une sélection en laboratoire dans une population de *Drosophila melanogaster*. La ligne pointillée rouge représente la courbe théorique de changement, calculée pour $W_{AA} = 1{,}0$; $W_{Aa} = 0{,}75$; $W_{aa} = 0{,}4$. (D'après R.C. Lewontin, *The Genetic Basis of the Evolutionary Change*. Copyright 1974 par Columbia University Press. Données fournies par E. Berger.)

$$\Delta p = pq\,\frac{\overline{W}_A - \overline{W}_a}{\overline{W}}$$

Dans quelles conditions ce processus s'arrêtera-t-il ? Quand Δp sera-t-il nul ? Deux réponses évidentes sont si $p = 0$ ou si $q = 0$ (c'est-à-dire, si l'un ou l'autre allèle, A ou a, a été éliminé de la population). L'une de ces deux situations se produira éventuellement si $\overline{W}_A - \overline{W}_a$ reste constamment positif ou négatif, de telle manière que Δp soit toujours positif ou négatif, indépendamment de la valeur de p. La condition d'une sélection unidirectionnelle est que la valeur adaptative de l'hétérozygote se situe entre les valeurs adaptatives des deux homozygotes : si $W_{AA} \geq W_{Aa} \geq W_{aa}$, les allèles A sont plus adaptés que les allèles a tant en condition héterozygote qu'homozygote. La valeur adaptive moyenne de A, $\overline{W}_A$, est plus élevée que celle de l'allèle a, $\overline{W}_a$, quelles que soient les fréquences de génotypes. Dans ce cas $\overline{W}_A - \overline{W}_a$ est positif, et A augmente toujours jusqu'à atteindre p = 1. Si, par contre, $W_{AA} \leq W_{Aa} \leq W_{aa}$, $\overline{W}_A - \overline{W}_a$ sera négatif, et a augmentera toujours jusqu'à atteindre $q = 1$.

Mais il existe une autre possibilité d'avoir $\Delta p = 0$, même si p et q ne sont pas nuls :

$$\overline{W}_A = \overline{W}_a$$

ce qui peut se produire si l'hétérozygote n'est pas intermédiaire entre les homozygotes mais présente une valeur adaptative plus extrême que chacun des homozygotes. Alors $\overline{W}_A > \overline{W}_a$ pour une série de valeurs de p, alors que $\overline{W}_A < \overline{W}_a$ pour le reste des valeurs. A la limite de ces deux séries, il y a une valeur de p (notée ici $\hat{p}$) pour laquelle les valeurs adaptatives moyennes des deux allèles sont égales. Une conversion algébrique de

$$\overline{W}_A - \overline{W}_a = 0 = (\hat{p}W_{AA} + \hat{q}W_{Aa}) - (\hat{p}W_{Aa} + \hat{q}W_{aa})$$

nous donne la solution pour p :

$$\hat{p} = \frac{W_{aa} - W_{Aa}}{(W_{aa} - W_{Aa}) + (W_{AA} - W_{Aa})}$$

La valeur à l'équilibre est simplement un rapport des différences de valeurs adaptatives entre homozygotes et hétérozygotes. Supposons que les valeurs adaptatives soient :

$$\frac{W_{AA}}{0{,}9} \qquad \frac{W_{Aa}}{1{,}0} \qquad \frac{W_{aa}}{0{,}8}$$

l'équilibre sera $\hat{p} = 2/3$

Il existe, en fait, deux possibilités qualitativement différentes en ce qui concerne $\hat{p}$. L'une d'entre elles est que $\hat{p}$ soit un équilibre *instable*. Il n'y aura pas de changements dans la fréquence, si la population a exactement cette valeur de p, mais la fréquence s'éloignera de cet équilibre (vers $p = 0$ ou $p = 1$) à la plus petite perturbation de fréquence. Cette situation instable se présentera lorsque l'hétérozygote a une aptitude plus faible que chacun des homozygotes; une telle situation constitue un exemple de **sous-dominance**. L'alternative consiste en un équilibre stable, ou **polymorphisme équilibré** : dans cette situation, de petites modifications de la valeur de $\hat{p}$ entraîneront le retour vers $\hat{p}$. Cet équilibre se réalise à condition que l'hétérozygote ait une valeur adaptative plus grande que celle de chaque homozygote — une situation appelée **surdominance**.

Dans la nature, la probabilité que la fréquence d'un gène demeure en équilibre, lorsque ce dernier est instable est négligeable et nous ne nous attendons pas à trouver des polymorphismes naturels où les hétérozygotes ont une valeur adaptative moindre que celle des homozygotes. Au contraire, le fait qu'un polymorphisme se maintienne dans des conditions naturelles, pourrait être tenu comme une évidence de poids en faveur d'un hétérozygote surdominant.

Malheureusement, la réalité biologique dément la théorie. Le locus Rh (groupe sanguin rhésus) chez l'homme présente un polymorphisme très répandu avec des allèles Rh^+ et Rh^-. Chez les Européens, la fréquence de l'allèle Rh^- est d'environ 0,4, alors qu'en Afrique elle est de 0,2. Ceci doit donc représenter un polymorphisme très ancien, antérieur à l'origine des races géographiques modernes. Mais ce polymorphisme entraîne une incompatibilité mère-foetus lorsqu'une mère Rh^- (homozygote Rh^-/Rh^-) produit un foetus Rh^+ (hétérozygote Rh^-/Rh^+). Cette incompatibilité est la cause de l'anémie hémolytique (par destruction des globules rouges)et de la mort du foetus dans une proportion modérée des cas. Une sélection s'exerce donc contre les hétérozygotes. Ce

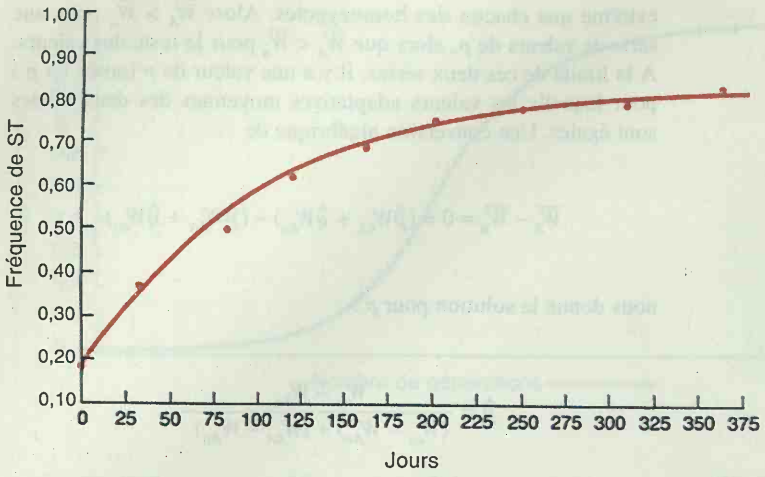


Figure 26-18. Modification de la fréquence de l'inversion *Standard* (ST) placée en compétition avec *Chiricahua* (CH) dans une population de laboratoire de *Drosophila pseudoobscura*. Les points désignent les fréquences établies dans les générations successives. La courbe représente l'évolution théorique de changement, si les valeurs adaptives des génotypes sont celles données dans le texte.

polymorphisme est instable et devrait avoir disparu; cependant il existe dans la plupart des populations. De nombreuses hypothèses ont été émises pour expliquer cette apparente stabilité, mais le mystère demeure.

A l'opposé, aucune différence de valeur adaptative n'a pu être démontrée pour de nombreux polymorphismes sanguins (et pour le polymorphisme ubiquiste d'enzymes révélé par l'électrophorèse). De tels polymorphismes ne seraient pas soumis à sélection, mais refléteraient bien que

$$W_{AA} = W_{Aa} = W_{aa}$$

La situation de **neutralité adaptative** devrait, cela va de soi, aussi satisfaire l'exigence que $\overline{W}_A = \overline{W}_a$, mais, au lieu d'un équilibre stable, elle donne lieu à un **équilibre passif** (ou **neutre**) où n'importe quelle fréquence allélique p est aussi stable qu'une autre. Ceci ne permet pas de répondre à la question de savoir comment les populations devinrent très polymorphes au départ. Néanmoins, il est évident que la présence d'un polymorphisme généralisé ne constitue pas nécessairement une preuve de l'existence d'hétérozygotes surdominants. Le meilleur cas de surdominance pour une valeur adaptative d'un allèle à un locus unique demeure celui de l'anémie à cellules falciformes, où les deux homozygotes sont désavantagés par rapport à l'hétérozygote pour des raisons tout à fait différentes.

Les exemples les plus étudiés de polymorphisme équilibré dans la nature et en laboratoire ont trait aux polymorphismes d'inversions chez plusieurs espèces de *Drosophila*. L'évolution du changement de fréquence de l'inversion ST par rapport au remaniement alternatif CH est décrite à la figure 26-18 dans une population de laboratoire de *Drosophila pseudoobscura*. Les inversions ST et CH font partie du polymorphisme chromosomique dans les populations naturelles de cette espèce. Les valeurs adaptatives estimées pour les trois génotypes en laboratoire sont

$$W_{ST/ST} = 0{,}89 \qquad W_{ST/CH} = 1{,}0 \qquad W_{CH/CH} = 0{,}41$$

En appliquant cette formule pour calculer la valeur à l'équilibre $\hat{p}$, nous obtenons $\hat{p} = 0{,}85$, ce qui est parfaitement conforme aux données montrées à la figure 26-18.

Sommets adaptatifs multiples

Il faut se garder d'avoir une vision simpliste des conséquences de la sélection. Au niveau du gène — ou même au niveau d'une partie du phénotype — le résultat de la sélection pour un caractère déterminé n'est pas univoque. Une sélection destinée à modifier un caractère (disons, augmenter la taille) peut être menée à bien d'un grand nombre de façons. En 1952, F. Robertson et E. Reeve ont réussi une sélection visant à changer la taille des ailes chez *Drosophila* dans deux populations différentes. Cependant, dans l'un des cas le *nombre* des cellules de l'aile fut modifié, tandis que dans l'autre le changement concernait la *taille* des cellules des ailes. Des génotypes différents avaient été sélectionnés, tous deux aboutissant à modifier la taille des ailes. Ce fut l'état initial de la population au moment où fut exercée la pression sélective qui détermina quel type de sélection opéra.

Que la même pression de sélection puisse aboutir à des résultats différents peut être facilement illustré par un exemple. Supposons que la variation de deux loci (habituellement, ils seront bien plus nombreux) influence un caractère et que (dans un environnement donné) les phénotypes intermédiaires présentent l'aptitude la plus élevée. (Par exemple, les nouveau-nés ont une plus grande chance de survie s'ils ne sont ni trop petits, ni trop grands). Si tous les allèles influencent le phénotype d'une façon simple, les trois génotypes *AaBb*, *AAbb*, et *aaBB* auront une valeur adaptative élevée parce qu'ils sont tous intermédiaires du point de vue du phénotype. Par contre, les doubles homozygotes *AABB* et *aabb* se caractériseront par une valeur adaptative faible. Quelle sera le résultat de la sélection? Les résultats peuvent être prédits en utilisant la valeur adaptative moyenne $\overline{W}$ d'une population. Comme nous l'avons montré auparavant, la sélection agit dans les cas les plus simples en augmentant $\overline{W}$. Donc, en calculant $\overline{W}$ pour chaque combinaison possible de fréquences des gènes aux deux loci, nous pouvons établir quelles combinaisons fournissent les valeurs de $\overline{W}$ les plus élevées. Dès lors, nous serons capables de prédire le cours de la sélection en suivant la courbe d'accroissement de $\overline{W}$.

La surface des valeurs adaptatives moyennes pour toutes les combinaisons possibles de fréquences alléliques est appelée une **surface adaptative**, ou un **paysage adaptatif** (figure 25-19). La figure ressemble à une carte topographique. La fréquence de l'allèle *A* d'un locus est portée sur l'un des axes, et la fréquence de

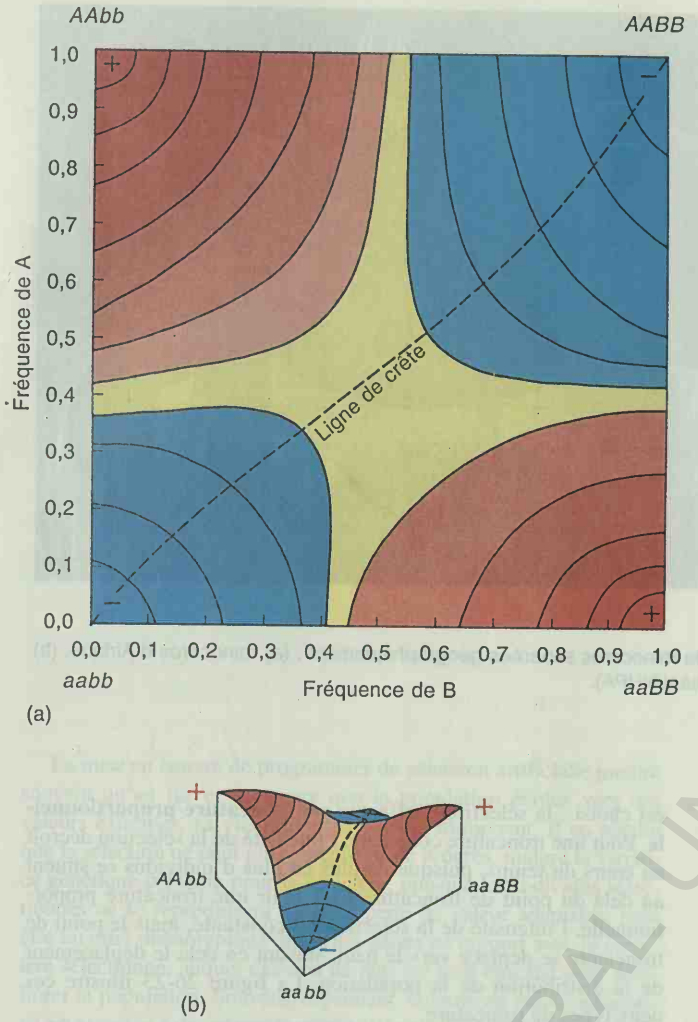


Figure 26-19. Diagramme de «paysages adaptatifs» comprenant deux pics adaptatifs (rouge), deux dépressions adaptatives (bleues) et une crête topographique au centre du diagramme. Les courbes de niveau sont des lignes de valeur adaptative moyenne. Si la constitution génétique d'une population change toujours de façon telle que la population «grimpe» dans le diagramme, la constitution finale dépendra d'où la population se situe au départ par rapport à la ligne de crête (en pointillé). (a) Carte topographique du diagramme adaptatif. (b) Un dessin en perspective de la surface décrite sur la carte.

l'allèle *B* d'un autre locus est portée sur l'autre axe. La hauteur au-dessus du plan (représentée par les courbes topographiques) donne la valeur de $\overline{W}$ que la population aurait pour une combinaison particulière des fréquences de *A* et de *B*. Selon la règle de l'accroissement de la valeur adaptative, la sélection conduirait la population d'une «vallée» à basse valeur adaptative vers un «sommet» à haute valeur adaptative. Cependant, la figure 25-19 comporte deux sommets adaptatifs, correspondant à une population fixée *AAbb* et à une autre population fixée *aaBB*, séparées par une vallée adaptative. Le fait que la population»grimpera» vers l'un ou l'autre sommet - et donc sa composition génétique finale - dépend de ce que la composition génétique initiale de la population se situe de l'un ou de l'autre côté de «la ligne de col» (en pointillé sur la figure).

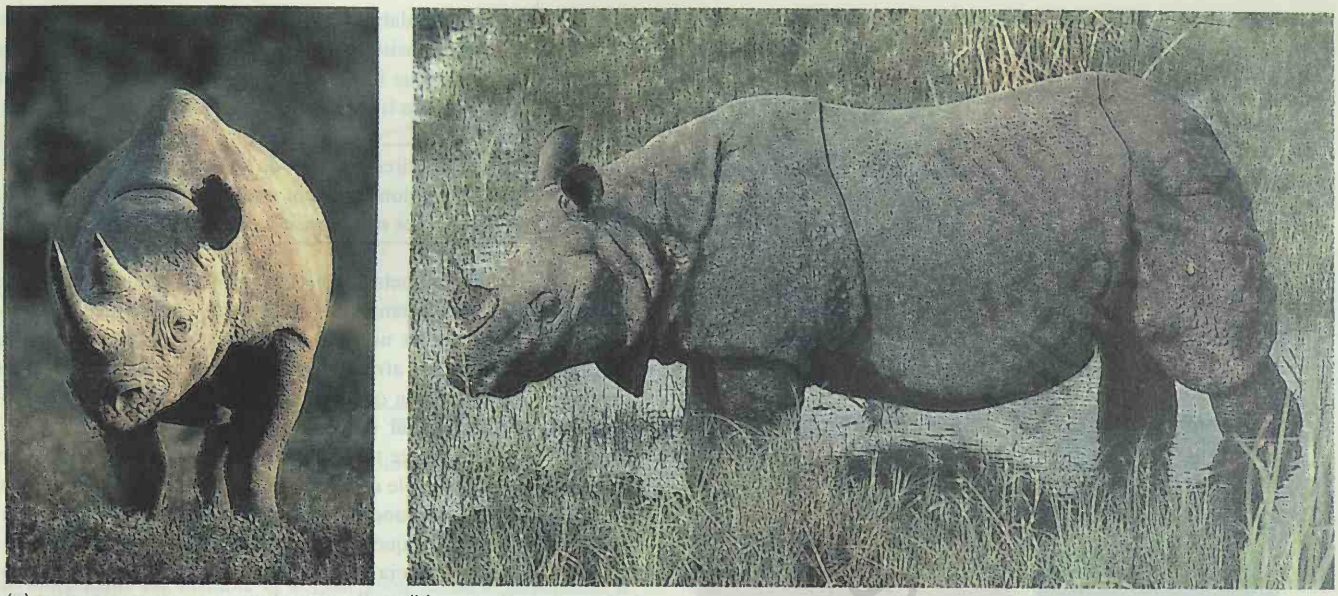
Message Dans des circonstances de sélection naturelle identiques, deux populations peuvent atteindre des compositions génétiques différentes en réponse à cette sélection.

L'existence de sommets adaptatifs multiples pour un processus sélectif indique que certaines des différences entre espèces sont le résultat de l'histoire et non de différences dues au milieu. Par exemple, le rhinocéros africain possède deux cornes alors que le rhinocéros indien n'en a qu'une (figure 26-20). N'affabulons pas pour essayer d'expliquer qu'avoir deux cornes dans les plaines africaines est un avantage tout comme le serait la corne unique aux Indes. Il est plus plausible que la possession de cornes relativement longues et minces ou d'une corne courte et trapue constituent simplement des caractéristiques adaptatives alternatives et qu'un accident historique différencia les espèces. Une explication des adaptations par sélection naturelle n'implique pas nécessairement que chaque différence entre espèces doive être considérée comme une différence adaptative.

Il nous faut souligner que rien dans la théorie de la sélection n'implique que les différents sommets adaptatifs se situent à la même hauteur. La cinétique de la sélection est telle que $\overline{W}$ augmente, mais pas qu'elle atteigne nécessairement le plus haut sommet possible du point de vue des fréquences géniques. Supposons, par exemple, qu'une population soit près du sommet *AAbb* sur la figure 26-19 et que ce sommet se situe plus bas que le sommet *aaBB*. La sélection ne peut mener à elle seule la population vers *aaBB* puisque cela exigerait une diminution temporaire de $\overline{W}$ lors de la descente de la population *AAbb* le long de la pente, sa traversée du fond de la vallée et sa remontée le long de l'autre pente. Donc, la force adaptative est myope. Elle conduit la population jusqu'à un maximum *local* de $\overline{W}$ du point de vue des fréquences géniques - et non pas jusqu'à un maximum *global*.

Sélection artificielle

Alors qu'il est difficile de trouver dans des populations naturelles des cas simples, bien circonstanciés qui illustrent les formules de la sélection naturelle, les exemples abondent sur l'efficacité de la sélection artificielle dans la modification phénotypique des populations. Ces changements ont été produits par des expériences de sélection en laboratoire et par la sélection d'animaux et de plantes en agriculture (comme l'augmentation de la production laitière chez les vaches, ou la résistance à la rouille chez le blé). L'analyse de ces expériences en termes de fréquences alléliques n'est pas possible puisqu'aucun locus individuel n'a été identifié et suivi. Néanmoins, des changements génétiques sont très clairement apparus dans ces populations et certaines analyses des populations sélectionnées ont pu être menées selon les méthodes décrites au chapitre 27. La figure 26-21 donne en exemple les variations importantes qui se sont produites dans le nombre moyen de soies au cours d'une expérience de sélection chez *Drosophila melanogaster*. La figure 26 - 22 décrit les changements du nombre d'oeufs pondus par poule suite à une sélection menée sur 30 années.



(a) (b)

Figure 26-20. Différences de la forme des cornes chez deux espèces de rhinocéros séparées géographiquement : (a) rhinocéros d'Afrique. (b) rhinocéros des Indes. ((a) cliché d'Anthony Bannister/NHP; (b) de K. Ghani/NHPA).

Pour des caractères à héritabilité élevée, la méthode classique de sélection est la **sélection tronquée**. Les individus d'une génération donnée sont groupés (sans tenir compte de leur appartenance familiale), un échantillon est mesuré, et seuls les individus au delà (ou en-deçà) d'une valeur phénotypique établie (le point de troncature) sont choisis comme parents pour la génération suivante. Cette valeur peut être une valeur fixée au cours de générations successives : la sélection se déroule alors par **troncature constante**. Plus souvent, un pourcentage fixé de la population représentant la valeur la plus élevée (ou la plus basse) du caractère sélectionné est choisi : la sélection s'effectue par **troncature proportionnelle**. Pour une troncature constante, l'intensité de la sélection décroît au cours du temps, puisque de plus en plus d'individus se situent au delà du point de troncature fixé. Pour une troncature proportionnelle, l'intensité de la sélection est constante, mais le point de troncature se déplace vers le haut, suivant en cela le déplacement de la distribution de la population. La figure 26-23 illustre ces deux types de troncature.

Quel que soit le schéma de sélection utilisé, l'héritabilité au sens restreint diminuera finalement lorsque les allèles sélectionnés seront fixés : le progrès deviendra de plus en plus difficile à réaliser et s'arrêtera dès que h^2 atteindra 0. Pour des caractères dont l'héritabilité est faible au départ, une forme de sélection familiale est utilisée (voir page ...)

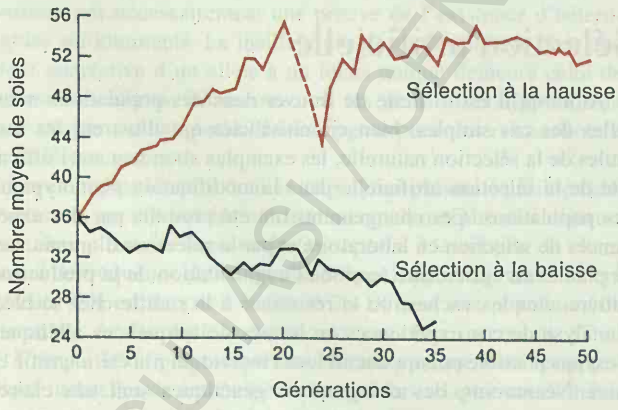


Figure 26-21. Changements du nombre moyen de soies obtenus chez deux populations de laboratoire de *Drosophila melanogaster* par sélection artificielle pour un nombre élevé de soies chez l'une des populations et pour un nombre faible de soies chez l'autre. Le segment pointillé dans la courbe établie pour la lignée sélectionnée pour des nombres élevés de soies correspond à une période couvrant cinq générations durant lesquelles aucune sélection n'a été exercée. (D'après K. Mather et B.J. Harrison, «The Manifold Effects of Selection», *Heredity*, 3, 1949, 1-52.)

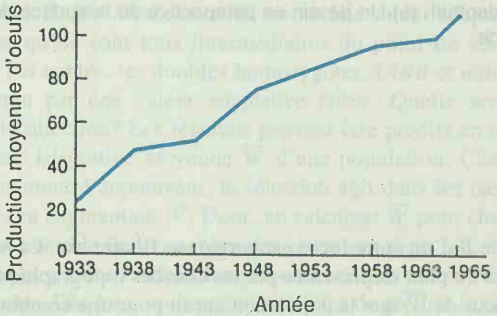


Figure 26-22. Evolution de la production moyenne d'oeufs dans une population de poules sélectionnées pour l'accroissement du taux de ponte sur une période de 30 ans (D'après I.M. Lerner et W.J. Libby, *Heredity, Evolution and Society*, 2ième éd. Copyright 1976 par W.H. Freeman and Company. Données dues à l'amabilité de D.C. Lowry.)

CUJAS / CENTRE UNIVERS

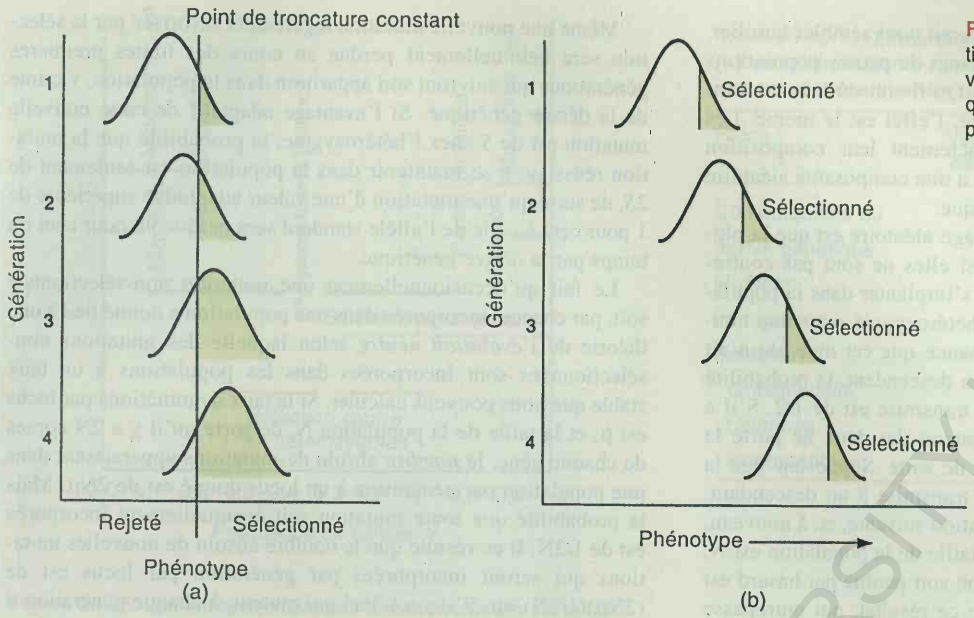


Figure 26-23. Deux schémas de sélection tronquée dans le cas d'un trait à variation continue. (a) Sélection tronquée constante. (b) Sélection tronquée proportionnelle.

La mise en oeuvre de programmes de sélection artificielle montre souvent qu'au fur et à mesure que la population évolue vers des valeurs extrêmes, sa viabilité et sa fertilité diminuent. Il en résulte que la sélection ne peut plus enregistrer de progrès, malgré la variance génétique présente pour le caractère, puisque les individus sélectionnés ne se reproduisent plus. La perte de valeur adaptative peut être un effet phénotypique direct des gènes en rapport avec le caractère sélectionné, auquel cas rien de plus ne peut être fait pour améliorer la population. Souvent, cependant, la perte de valeur adaptative est associée à des gènes de stérilité liés aux loci sélectionnés. Dans de tels cas, un nombre de générations sans sélection permet l'obtention de recombinants et la sélection peut alors être poursuivie, comme pour la lignée sélectionnée vers le haut sur la figure 26-21.

Nous devons être prudents dans l'interprétation des programmes à long terme d'amélioration en agriculture. Des innovations dans les méthodes de culture, l'outillage, les engrais, les insecticides et herbicides, etc. se produisent parallèlement à la production de variétés génétiquement améliorées. Les augmentations des rendements moyens sont la conséquence de tous ces changements. Par exemple, le rendement moyen du maïs aux Etats-Unis est passé de 40 boisseaux à 80 boisseaux par acre entre 1940 et 1970 c'est-à-dire de 36 à 72 Quintaux/Ha : aux Etats-Unis, la production de céréales est mesurée en unités de capacité, et non en quintaux. Mais des expériences menées pour comparer nouvelles et anciennes variétés de maïs dans des milieux similaires ont montré que seulement la moitié de cette augmentation pouvait être attribuée aux variétés nouvelles (l'autre moitié provenant de l'amélioration des techniques culturales). En outre, les variétés nouvelles se sont montrées supérieures aux anciennes aux hautes densités de semis utilisées en agriculture moderne et pour lesquelles elles avaient été sélectionnées.

Evénements fortuits

Si l'effectif d'une population est limité (comme c'est presque toujours le cas) et si un couple donné de parents n'a qu'un petit nombre de descendants, même en l'absence de toute pression de sélection, la fréquence d'un gène ne sera pas exactement la même à la génération suivante du fait de la non- reproductibilité de l'échantillonnage. Si dans une population de 1000 individus, la fréquence de *a* est de 0,5 parmi les individus qui composent une génération, elle peut être de 0,493 ou de 0,505 à la génération suivante, du fait de la formation au hasard de quelques descendants en plus ou en moins de chaque génotype. A la seconde génération, l'erreur d'échantillonnage basée sur la nouvelle fréquence du gène, conduira la fréquence de *a* de 0.505 à 0.511 ou, en sens inverse à 0,498. Ce processus de fluctuations aléatoires se poursuit de génération en génération, sans qu'aucune force s'exerce pour ramener la fréquence à sa valeur initiale puisque la population n'a pas de «mémoire génétique» de l'état où elle se trouvait de nombreuses générations auparavant. Chaque génération constitue un événement indépendant. Le résultat final de ces changements fortuits des fréquences alléliques se traduit par la dérive de la population vers p=1 ou p=0. A ce stade, il n'y a plus de changement possible; la population est devenue homozygote. Une population différente, isolée de la première, subit aussi cette **dérive génétique fortuite**, mais elle peut devenir homozygote pour l'allèle *A*, alors que la première population l'était devenue pour l'allèle *a*. Au cours du temps, les populations isolées divergent l'une de l'autre, chacune d'entre elles perdant de l'hétérozygotie. La variation originellement présente *au sein* des populations se perçoit maintenant comme une variation *entre* populations.

Une forme de dérive génétique se produit lorsqu'un petit groupe se sépare d'une population plus grande pour fonder une nouvelle colonie. Cette «dérive prononcée», dénommée **effet de fondation**, résulte d'une seule génération d'échantillonnage, suivie de nombreuses générations au cours desquelles la population demeure réduite. L'effet de fondation est probablement responsable de l'absence totale du groupe sanguin B chez les Indiens d'Amérique, dont les ancêtres ont migré en très petit nombre à travers le détroit de Behring à la fin de la dernière glaciation il y a environ 20.000 ans.

BASIC UNIVERSITY LIBRARY

Le processus de dérive génétique devrait nous sembler familier. Il nous ramène à la consanguinité au sein de petites populations dont nous avons parlé précédemment. Qu'il soit dû à la consanguinité ou à l'échantillonnage aléatoire, l'effet est le même. Les populations ne reproduisent pas exactement leur composition génétique à la génération suivante; il y a une composante aléatoire dans le changement de fréquence génique.

Une conséquence de l'échantillonnage aléatoire est que la plupart des nouvelles mutations, même si elles ne sont pas contre-sélectionnées, ne réussissent jamais à s'implanter dans la population. Supposons qu'un individu soit hétérozygote pour une nouvelle mutation. Il y a une certaine chance que cet individu n'ait aucune descendance. Même s'il y a un descendant, la probabilité que la nouvelle mutation ne soit pas transmise est de 1/2. S'il a deux descendants, la probabilité qu'aucun des deux ne porte la nouvelle mutation est de 1/4, et ainsi de suite. Supposons que la nouvelle mutation soit effectivement transmise à un descendant. Cette loterie se répète alors à la génération suivante, et, à nouveau, l'allèle peut être perdu. De fait, si la taille de la population est N, la probabilité qu'une nouvelle mutation soit perdue par hasard est $(2N\text{-}1)/\ 2N$. (Pour établir l'origine de ce résultat, qui outrepasse l'objet de ce traité, voir les chapitres 2 et 3 de Hartl et Clark, *Principles of Population Genetics*). Si cette nouvelle mutation n'est pas perdue, la seule chose qui puisse lui arriver dans une population à effectif limité c'est de s'y implanter et de s'y fixer. La probabilité d'un tel événement est de $1/2N$. En absence de sélection, l'histoire de la population ressemble dès lors à ce qui est décrit sur la Figure 26-24. Pendant un certain temps, elle est homozygote; survient alors une nouvelle mutation. Dans la plupart des cas, le nouvel allèle mutant sera perdu immédiatement ou très peu de temps après son apparition. De temps en temps, cependant, un nouvel allèle se répandra dans la population, et celle-ci deviendra homozygote pour ce dernier. Le processus est susceptible de se répéter.

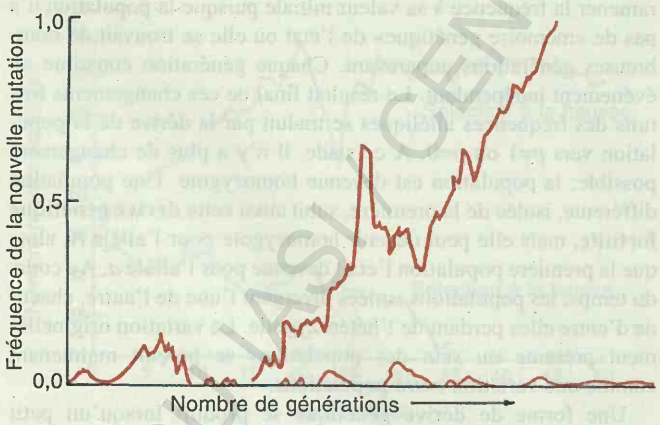


Figure 26-24. L'apparition, la perte et l'éventuelle fixation de nouvelles mutations au cours de la vie d'une population. Si la dérive génétique n'entraîne pas la perte d'une nouvelle mutation, elle doit éventuellement entraîner l'ensemble de la population à devenir homozygote pour la mutation (en l'absence de sélection). La figure montre l'apparition de 10 mutations dont 9 augmentent légèrement en fréquence et puis s'éteignent. Seul la quatrième mutation se répand en fin de compte dans la population. (D'après J. Crow et M. Kimura, *An Introduction to the Population Genetics Theory*, Copyright 1970 chez Harper & Row).

Même une nouvelle mutation légèrement favorisée par la sélection sera habituellement perdue au cours des toutes premières générations qui suivront son apparition dans la population, victime de la dérive génétique. Si l'avantage adaptatif de cette nouvelle mutation est de S chez l'hétérozygote, la probabilité que la mutation réussisse à se maintenir dans la population est seulement de $2S$, de sorte qu'une mutation d'une valeur adaptative supérieure de 1 pour cent à celle de l'allèle standard sera perdue 98 pour cent du temps par la dérive génétique.

Le fait qu'occasionnellement une mutation non-sélectionnée soit, par chance, incorporée dans une population a donné lieu à une théorie de l'*évolution neutre* selon laquelle des mutations non-sélectionnées sont incorporées dans les populations à un taux stable que nous pouvons calculer. Si le taux de mutations par locus est μ, et la taille de la population N, de sorte qu'il y a 2N copies de chaque gène, le *nombre* absolu de mutations apparaissant dans une population par génération à un locus donné est de $2N\mu$. Mais la probabilité que toute mutation soit éventuellement incorporée est de 1/2N. Il en résulte que le nombre absolu de nouvelles mutations qui seront incorporées par génération par locus est de $(2N\mu)(1/2N) = \mu$. S'il y a k loci qui mutent, à chaque génération il y aura $k\mu$ mutations nouvellement incorporées dans le génome. Ceci est un résultat très marquant, parce qu'il prévoit un taux d'évolution d'une régularité d'horloge indépendant des circonstances extérieures et ne dépendant que du taux de mutation que nous pouvons considérer comme constant au cours de longues périodes de temps. La divergence génétique totale entre espèces devrait, selon cette théorie, être proportionnelle au temps écoulé depuis leur séparation au cours de l'évolution. On a proposé qu'une partie importante de l'évolution des séquences d'acides aminés des protéines s'est produite sans sélection et que l'évolution des bases synonymes et d'autres ADN qui ne codent ni pour des protéines ni pour des substances régulatrices de la synthèse de protéines se comporterait comme une *horloge moléculaire* à taux constant et ce pour toutes les lignées évolutives. Evidemment, des protéines différentes possèdent des rythmes d'horloge différents, en fonction de la proportion de leurs acides aminés qui peuvent être substitués sans effets sélectifs.

Message De nouvelles mutations peuvent s'établir dans une population, même si elles ne sont pas favorisées par la sélection naturelle, par un simple processus de dérive génétique fortuite. Des mutations, même avantageuses, sont souvent perdues.

Une synthèse des forces évolutives

Variation et divergence au sein des populations.

La variation génétique au sein et entre des populations est le résultat de l'interaction des diverses forces évolutives (figure 26-25). Comme décrit au tableau 25-13, les forces qui augmentent ou maintiennent la variation au sein des populations empêchent généralement celles-ci de se différencier les unes des autres, alors que la divergence des populations provient des forces qui tendent à rendre chaque population homozygote. Donc, la dérive génétique et l'endogamie conduisent à l'homozygotie tout en amenant différentes populations à diverger. Cette divergence et cette homozygotie sont contrecarrées par le flux constant de mutation et de migra-

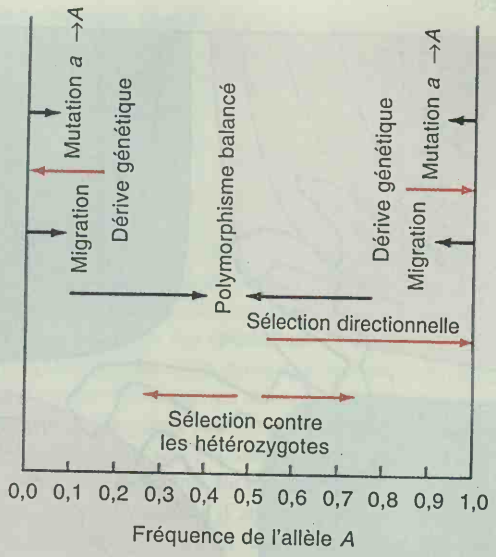


Figure 26-25. Les effets des diverses forces évolutives sur la fréquence génique. Les flèches noires indiquent une tendance vers une augmentation de la variation dans la population; les flèches rouges, une diminution.

tion d'un site à l'autre, qui réintroduit la variation dans les populations et tend à maintenir la ressemblance entre elles.

Les effets de la sélection sont plus variés. La **sélection directionnelle** entraîne une population vers l'homozygotie, en rejetant la plupart des nouvelles mutations au fur et à mesure de leur introduction, mais peut occasionnellement (si la mutation est favorable) répandre un nouvel allèle au sein de la population pour créer un nouvel état homozygote. Que cette sélection directionnelle stimule la différenciation des populations ou non dépend à la fois du milieu et d'événements fortuits. Deux populations établies dans des milieux très semblables peuvent être maintenues génétiquement semblables par la sélection directionnelle, mais, si des différences entre milieux existent, la sélection peut diriger les populations vers des constitutions différentes.

Un cas particulier intéressant, spécialement chez les populations humaines, concerne l'interaction entre mutation et sélection directionnelle dans une population à effectif important. Des néomutations défavorables se produisent de manière constante, soit spontanément soit sous l'action de mutagènes. La sélection les élimine de la population, mais un équilibre va s'établir entre leur apparition et leur retrait. Si q est la fréquence de l'allèle défavorable et $p = 1 - q$ celle de l'allèle normal, le changement de fréquence allélique due au taux de mutation μ est

$$\Delta q_{mut} = \mu p$$

Une façon simple d'exprimer les valeurs adaptatives d'un gène récessif défavorable est $W_{AA} = W_{Aa} = 1{,}0$ et $W_{aa} = 1\text{-}s$, où s représente la perte de valeur adaptative chez les homozygotes. Nous pouvons à présent substituer ces valeurs adaptatives dans l'expression générale du changement de fréquence allélique (voir page) et obtenir

$$\Delta q_{sel} = -\frac{pq(sq)}{1 - sq^2}$$

L'équilibre signifie que l'accroissement de la fréquence allélique dû à la mutation doit exactement compenser la diminution de la fréquence allélique due à la sélection, de sorte que

$$\Delta\hat{q}_{mut} + \Delta\hat{q}_{sel} = 0$$

En nous rappelant que q à l'équilibre doit être très petit, de sorte que $1\text{-}sq^2 \approx 1$, et en substituant les termes pour $\Delta\hat{q}_{mut}$ et $\Delta\hat{q}_{sel}$ dans les formules ci-dessus nous obtenons

$$\mu\hat{p} - \frac{s\hat{p}\hat{q}^2}{1 - s\hat{q}^2} = \mu\hat{p} - s\hat{p}\hat{q}^2 = 0$$

ou

$$q^2 = \frac{\mu}{s} \quad \text{et} \quad \hat{q} = \sqrt{\frac{\mu}{s}}$$

Par exemple, un récessif létal ($s = 1$) apparaissant à un taux de $\mu = 10^{-6}$ aura une fréquence à l'équilibre de 10^{-3}. En fait, si nous savions qu'un gène était récessif létal et n'avait pas d'effet en tant qu'hétérozygote nous aurions pu estimer son taux de mutation comme étant le carré de la fréquence allélique. La base sur laquelle se fondent de tels calculs doit cependant être bien établie. L'anémie à cellules falciformes fut autrefois considérée comme due à un récessif létal sans effets à l'état hétérozygote, ce qui conduisit à une estimation de 0,1 pour le taux de cette mutation en Afrique!

Si nous prenons des valeurs adaptatives de W_{AA}=1,0, W_{aA}= 1-hs, and W_{aa} = 1-s pour un gène à dominance partielle, où h désigne le degré de dominance de l'allèle défavorable, un calcul similaire nous donne

Tableau 26-13. Effets des forces évolutives sur l'accroissement (+) ou la diminution (-) de la variation respectivement au sein des populations et entre populations.

Force	Variation au sein des populations	Variation entre populations
Consanguinité ou dérive génétique	–	–
Mutation	+	–
Immigration	+	–
Sélection		
directionnelle	–	+/–
balancée	+	–
incompatible	–	+

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\hat{q} = \frac{\mu}{hs}$$

Donc, si m = 10^{-6} et que l'allèle létal n'est pas totalement récessif mais provoque 5% d'effets défavorables chez les hétérozygotes (s = 1,0 ; h = 0,05), il en résulte que

$$\hat{q} = \frac{10^{-6}}{5 \times 10^{-5}} = 2 \times 10^{-5}$$

ce qui est inférieur de deux ordres de grandeur à la fréquence d'équilibre pour le cas d'un allèle purement récessif. En général, nous pouvons nous attendre à ce que des gènes défavorables et complètement récessifs se présentent à des fréquences bien plus élevées que des gènes partiellement dominants.

La sélection en faveur des hétérozygotes (sélection équilibrante), maintiendra des polymorphismes plus ou moins similaires dans des populations différentes. Cependant, si les milieux sont suffisamment contrastés, les populations montreront une certaine divergence. A l'opposé de la sélection équilibrante se situe la sélection contre les hétérozygotes, qui produit des équilibres instables. Ce genre de sélection entraîne l'homozygotie et la divergence parmi les populations.

L'exploration des sommets adaptatifs

Le jeu du hasard et les forces de sélection ne devraient pas être considérés comme simplement antagonistes. La dérive génétique peut contrecarrer la pression de sélection, mais peut aussi bien la stimuler. Le processus évolutif est la résultante de l'exercice simultané de ces deux forces. La figure 26-26 illustre ces possibilités. Notez qu'il y a plusieurs sommets adaptatifs dans ce paysage. Suite à la dérive génétique, une population soumise à la sélection ne parvient pas au sommet de façon régulière. Au contraire, elle suit un parcours erratique au niveau des fréquences de gènes, comme un alpiniste privé d'oxygène. Le cheminement I décrit l'histoire d'une population où l'adaptation a échoué. Les variations aléatoires de la fréquence génique se sont montrées suffisamment importantes pour fixer la population dans un génotype inadapté. Dans toute population, une certaine proportion des loci est fixé pour un allèle adaptativement défavorable puisque l'intensité de la sélection est insuffisante pour surmonter la dérive génétique entraînant la fixation. Il faut faire preuve d'une grande dose de scepticisme vis-à-vis de théories évolutives naïves selon lesquelles les populations tendent toujours ou quasi toujours vers une constitution optimale par la sélection. L'existence de sommets adaptatifs multiples et la fixation au hasard d'allèles moins adaptés sont des caractéristiques à part entière du processus évolutif. On ne peut compter sur la sélection naturelle pour produire le meilleur des mondes possibles.

Le cheminement II à la figure 26-26, par contre, montre comment la dérive génétique peut améliorer l'adaptation. La population était initialement dans la sphère d'influence du sommet adaptatif inférieur; cependant, par une fluctuation aléatoire de la fréquence génique, sa constitution a franchi le col adaptatif, et la population s'est vue capturée par le sommet supérieur, plus abrupt. Ce passage d'un état adaptatif de faible niveau à un état stable plus élevé ne pourrait jamais se produire par sélection dans une population d'effectif illimité, puisque, par la seule sélection, $\overline{W}$ ne pourrait jamais décroître temporairement de façon à passer d'une pente à l'autre.

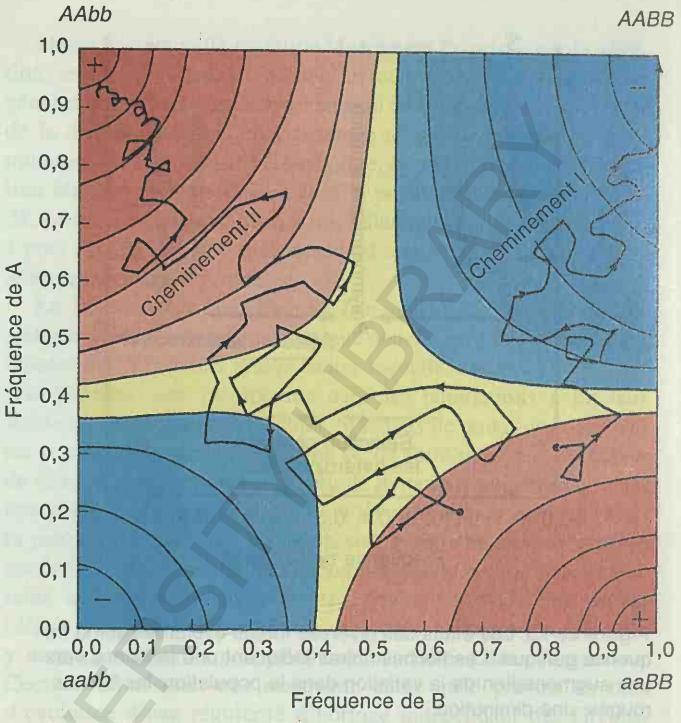


Figure 26-26. La sélection et la dérive génétique peuvent interagir pour produire différents changements de fréquence génique dans un paysage adaptatif. Sans dérive fortuite, les deux populations se seraient déplacées vers *aaBB* sous l'effet de la seule sélection.

Message L'interaction de la sélection et de la dérive génétique permet d'atteindre des états de valeur adaptative plus élevés que ceux accessibles par la seule sélection naturelle.

Une autre conséquence de l'interaction des forces aléatoires et sélectives fait que l'efficacité de la selection à déterminer la composition de la population dépende de la taille de cette population. L'ampleur de l'effet aléatoire est proportionelle à l'inverse de la taille de la population, $1/N$, tandis que l'ampleur d'une force déterminante dépend du taux de migration m, ou du taux de mutation μ, ou du coefficient de sélection s. Nous avons déjà mentionné (page) que migration et mutation sont efficaces si

$$m \geq 1/N \quad \text{ou} \quad \mu > 1/N$$

ce qui est , si

$$Nm \geq 1 \quad \text{ou} \quad N\mu > 1$$

La même chose est vraie pour la sélection; elle n'est efficace que si $Ns \geq 1$. Lorsque Ns est petit, puisque la sélection est faible ou la taille de la population petite, les mutations sont *effectivement neutres*, même si une certaine sélection s'exerce sur elles. De petites populations seront moins affectées par la sélection que de grandes même dans des conditions par ailleurs identiques. Par exemple, les populations humaines furent relativement petites au cours de l'histoire de notre espèce, leur accroissement ne s'étant produit qu'au cours des dernières centaines de générations. Donc,

MCGILL UNIVERSITY LIBRARY

nous pouvons nous attendre à trouver que de nombreuses mutations à présent soumises à la sélection furent en fait neutres pour une longue période et ont pu atteindre une fréquence élevée uniquement par chance.

L'origine des espèces

Par *espèce* (au moins chez des organismes se reproduisant sexuellement), nous désignons un groupe d'individus qui sont biologiquement capables de se croiser quoique déjà génétiquement isolés d'autres groupes. La **spéciation** - l'origine d'une nouvelle espèce - c'est l'origine d'un groupe d'individus au mode de vie différent et ayant développé en même temps une barrière s'opposant à l'échange de gènes avec l'espèce dont il est issu. La différenciation génétique d'une population par endogamie, dérive génétique, et sélection différentielle est toujours menacée par la réintroduction de gènes venant d'autres groupes par migration. La réduction de la migration à une valeur très basse constitue dès lors un préalable nécessaire à la spéciation.

Généralement, cette réduction est le résultat de l'isolement géographique de la population à la suite d'événements fortuits : quelques immigrants atteignent une île éloignée; une partie du continent peut être immergée par une montée du niveau de la mer; un insecte vecteur qui transmettait le pollen d'une population à une autre peut disparaître localement; la plaine herbeuse reliant les terrains de pâture de deux groupes d'herbivores peut, suite à une légère modification du rythme des pluies, devenir un désert. Une fois que la population est isolée physiquement, le processus de différenciation génétique se déroulera sans entraves jusqu'à ce que la constitution génétique de la population isolée soit si différente de celle de son groupe parental qu'elle entraîne de réelles difficultés de croisement.

Si la migration se rétablit avant cette période critique, il n'y aura pas de spéciation et les populations divergentes formeront à nouveau une entité. Ceci s'est déjà produit pour l'espèce humaine, chez laquelle la différenciation génétique de populations géographiques n'a jamais été au delà de quelques caractères physiques superficiels et de fréquences différentes pour des loci polymorphes. D'autre part, si les populations ont fort divergé avant qu'elles ne reviennent en contact l'une avec l'autre, les descendants hybrides auront des génotypes d'une valeur adaptative si faible qu'ils ne survivront pas ou seront stériles. A ce stade de différenciation, il y a un net avantage sélectif pour les individus des espèces en voie de formation à éviter de se croiser avec ceux de l'espèce-souche et à éviter ainsi le gaspillage de gamètes. De nouvelles barrières (secondaires) aux croisements peuvent alors être sélectionnées, achevant par là le processus de spéciation.

Au delà de ce schéma général de la spéciation, très peu peut en être dit avec certitude. Puisque les croisements interspécifiques ne sont pas fertiles, il est difficile d'analyser génétiquement leurs différences. Une grande part de notre connaissance provient d'un petit nombre de cas où quelques descendants hybrides ont pu être produits en laboratoire ou en jardin expérimental. Les méthodes d'électrophorèse, d'immunologie, et de séquençage des protéines ont permis la description des différences entre protéines d'espèces différentes, mais on ne connaît que peu d'espèces ayant récemment divergé; donc, nous ne savons pas quelle fraction de génome est impliquée dans la divergence initiale, pas plus que nous ne savons si cette divergence résulte le plus souvent d'une sélection en direction opposée ou plutôt d'une dérive génétique. Une analyse génétique détaillée du processus de spéciation demeure l'un des objectifs prioritaires de la génétique des populations.

RÉSUMÉ

Charles Darwin révolutionna l'étude de la biologie en élaborant une théorie de l'évolution basée sur les principes suivants : la variation existe au sein des populations, cette variation est héréditaire et le phénotype des individus de la population se modifie au cours des générations par l'action de la sélection naturelle. Ces principes fondamentaux de la théorie de l'évolution, mis en avant par Darwin dans *The Origin of Species* en 1859 - et donc antérieurement à toute connaissance de la génétique mendélienne - n'ont requis depuis cette époque que des modifications mineures. L'étude des variations au sein d'une population, autrement dit la génétique des populations, tente de relier les changements héréditaires des populations ou des organismes aux processus individuels sous-jacents de l'hérédité et du développement. La génétique des populations est l'étude de la variation transmise génétiquement et de ses modifications dans le temps et dans l'espace.

La variation génétique au sein d'une population peut s'étudier en observant les différences morphologiques entre individus, en examinant les différences entre séquences d'acides aminés des protéines, ou même, plus récemment, en examinant les différences entre séquences de nucléotides. Ces types d'observations ont permis de mettre en évidence, dans une population, un polymorphisme considérable pour de nombreux loci. Une mesure de cette variabilité se traduit par le niveau d'hétérozygotie de la population. Les études de populations ont montré qu'en général les différences génétiques entre individus au sein des races humaines sont bien plus grandes que les différences moyennes existant entre ces races.

La source majeure de toute variation est la mutation. Cependant, dans une population, la fréquence de génotypes spécifiques peut également être modifiée par recombinaison, par migration de gènes, par la persistance d'événements mutationnels, et par des mécanismes aléatoires.

L'une des conséquences de la ségrégation mendélienne est que les croisements au hasard produisent une distribution en équilibre des génotypes après une génération. Cependant, l'endogamie convertit la variation génétique présente dans la population en différences entre populations en rendant chaque population homozygote pour un allèle quelconque choisi au hasard. En outre, pour la plupart des populations, un équilibre s'établit pour tout milieu donné entre endogamie, mutation d'un allèle vers un autre, et migration.

Des changements «dirigés» de fréquences alléliques dans la population se produisent par la sélection naturelle d'un génotype favorisé. Dans de nombreux cas, ceci conduit à l'homozygotie pour un locus particulier. D'autre part, l'hétérozygote peut être mieux adapté à un milieu donné que l'un et l'autre des homozygotes, ce qui débouche sur un polymorphisme équilibré.

La sélection de génotypes spécifiques par le milieu est cependant rarement aussi simple. Le plus souvent, les phénotypes sont déterminés par l'interaction de plusieurs gènes, et les allèles à ces différents loci seront sélectionnés à des taux différents. En outre, des loci étroitement liés, sans rapport avec le phénotype en question, peuvent voir certains de leurs allèles transmis en même temps pendant le processus de sélection. En général, la variation génétique est le résultat de l'interaction des forces évolutives. Par exemple, un mutant récessif défavorable peut n'être jamais totalement éliminé de la population, puisque le phénomène de mutation ou d'immigration peut le réintroduire de manière continue dans la population. En outre, un allèle défavorable peut se trouver sélectionné dans des conditions de milieu qui nous échappent, y compris celles imposées par le reste de la composition génétique de l'individu.

A moins que des allèles alternatifs soient présents à des fréquences intermédiaires, la sélection est très lente, particulièrement à l'encontre des récessifs, et requiert de nombreuses générations. Dans de nombreuses populations, surtout celles de taille limitée, de nouvelles mutations peuvent s'établir, même si elles ne sont pas avantagées par la sélection naturelle, par un simple processus de dérive génétique fortuite. Ce type de changement lent des fréquences alléliques au sein du génome peut éventuellement aboutir à la formation de nouvelles espèces.

Diagramme conceptuel.

Faites un schéma associant autant que possible les termes suivants. Ceux-ci ne sont pas présentés dans un ordre donné.

fréquence allélique / hétérozygotie / polymorphisme / mutation / sélection / équilibre d'Hardy-Weinberg / migration / endogamie / dérive génétique / rapports mendéliens.

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Le polymorphisme pour la couleur (jaune ou rose) de la coquille et pour la présence ou l'absence des bandes sur la coquille de l'escargot *Cepaea nemoralis* (voir page 782) est le résultat de la ségrégation d'une paire d'allèles pour chacun des loci. Elaborez un programme expérimental qui mettra en évidence les forces déterminant la fréquence et la distribution géographique de ce polymorphisme.

Solution

a. Les fréquences des différentes types morphologiques sont établies pour un grand nombre de populations représentatives de l'aire géographique et écologique de l'espèce. Chaque escargot doit être évalué pour les deux types de polymorphisme. En même temps l'habitat de chaque population est enregistré. En outre, est évalué le nombre d'escargots par population.

b. En marquant un échantillon d'escargot par un tache de peinture sur la coquille, et en les replaçant dans la population, on peut, en les prélevant plus tard, mesurer les distances de migration.

c. En élevant un naissant d'escargots à partir d'individus, le génotype des parents mâles peut en être déduit et l'existence d'accouplements non-fortuits peut en être dérivée. Les fréquences de ségrégation au sein de chaque formule révèlera des différences entre génotypes en ce qui concerne la probabilité de survie des phases de développement précoces.

d. L'évidence de la sélection se recherche à partir (a) de clines géographiques dans les fréquences des allèles; (b) de la correlation entre la fréquence allélique et les variables écologiques, y compris la densité de population; (c) de la corrélation entre les fréquences de deux polymorphismes différents (les populations avec, disons une fréquence élevée de coquilles roses sont-elles caractérisées par, disons, une fréquence élevée de bandes sur les coquilles ?); (d) des associations non au hasard au sein des populations des allèles aux deux loci, indiquent que certaines combinaisons pourraient avoir une valeur adaptative plus élevée.

e. Une idée de l'importance de la dérive génétique peut être établie en comparant la variation des fréquences alléliques parmi de petites populations avec la variation parmi de grandes populations. Si les petites populations varient plus l'une par rapport à l'autre que les grandes, le phénomène de dérive génétique est dès lors impliqué.

BIBLIOTECA / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Environ 70 pour cent des Nord-Américains blancs peuvent apprécier le goût d'un composé chimique, la phényl-thio-carbamide, alors que le reste de la population ne lui trouve aucun goût. La capacité de déceler ce goût est un caractère mendélien dominant *T*, et l'incapacité à goûter est due à son allèle récessif *t*. En considérant que la population satisfait à l'équilibre de Hardy-Weinberg, quelles sont les fréquences génotypiques et alléliques de cette population ?

Solution

70 pour cent sont des goûteurs (*TT* ou *TE*) et donc 30 pour cent doivent être des non-goûteurs (*tt*). La fréquence des homozygotes récessifs équivaut à q^2, et donc pour obtenir q, nous prenons la racine carrée de 30 :

$$q = \sqrt{0{,}30} = 0{,}55$$

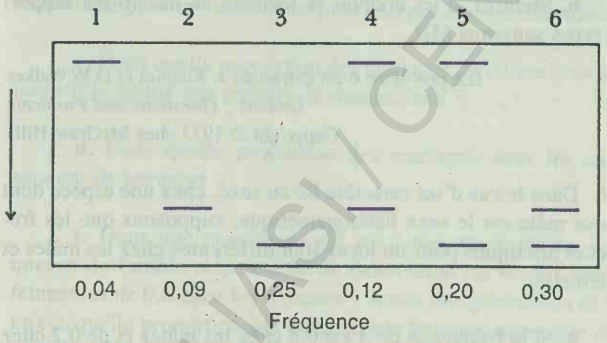
Puisque $p + q = 1$, nous pouvons écrire

$$p = 1 - q = 1 - 0{,}55 = 0{,}45$$

et nous pouvons calculer

$$p^2 = 0{,}45^2 = 0{,}20\ (TT)$$
$$2pq = 2 \times 0{,}45 \times 0{,}55 = 0{,}50(Tt)$$
$$q^2 = 0{,}3(tt)$$

2. Dans une population naturelle de *Mimulus guttatus*, un échantillon d'une feuille a été prélevé sur un grand nombre de plantes. Après broyage, les extraits de feuilles ont été soumis à l'électrophorèse sur gel. Le gel a été coloré pour un enzyme spécifique X. Six types différents de profil ont été observés avec les fréquences suivantes :



a. En supposant que ces profils sont dus à un seul locus, donnez une explication génétique pour ces six types.

b. Comment pouvez-vous tester votre idée ?

c. Quelles sont les fréquences alléliques dans la population?

d. La population satisfait-elle à l'équilibre de Hardy-Weinberg?

Solution

a. Le gel indique que les bandes peuvent occuper trois positions différentes : appelons-les lente, intermédiaire et rapide. En outre, chaque individu peut présenter une bande ou bien deux. L'explication la plus simple consiste à dire que trois allèles d'un seul locus (appelons-les A^L, A^I, et A^R) sont impliqués et que les individus à deux bandes sont des hétérozygotes. Il s'ensuit que 1 = *LL*, 2 = *II*, 3 = *RR*, 4 = *LI*, 5 = *LR*, et 6 = *IR*.

b. L'hypothèse peut être testée en réalisant des croisements spécifiques. Par exemple, l'autofécondation du type 5 doit conduire à obtenir 1/4 de *LL*, 1/2 de *LR* et 1/4 de *RR*.

c. Les fréquences peuvent se calculer par l'extension des formules à deux allèles. Soit

$$f(L) = 0{,}04 + 1/2\ (0{,}12) + 1/2\ (0{,}20) = 0{,}20$$

$$f(I) = 0{,}09 + 1/2\ (0{,}12) + 1/2\ (0{,}30) = 0{,}30$$

$$f(R) = 0{,}25 + 1/2\ (0{,}20) + 1/2\ (0{,}30) = 0{,}50$$

d. Les fréquences génotypiques de Hardy-Weinberg sont

$$(p + q + r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr$$

$$= 0{,}04 + 0{,}09 + 0{,}25 + 0{,}12 + 0{,}20 + 0{,}30$$

ce qui correspond précisément aux fréquences observées. On en conclut que la population est en équilibre.

3. Dans une vaste population de laboratoire de *Drosophila*, la valeur sélective d'un génotype récessif est estimée égale à 0,90 et le taux de mutation vers l'allèle récessif à 5×10^{-5}. Si la population est autorisée à atteindre son équilibre, quelles fréquences alléliques peuvent-elles être prédites ?

Solution

La mutation et la sélection opèrent ici en directions opposées, de telle sorte que l'on prédira l'établissement d'un équilibre, qui se traduira par la formule

$$\hat{q} = \sqrt{\frac{\mu}{s}}$$

Ici, $\mu = 5 \times 10^{-5}$ et $s = 1 - W = 1 - 0{,}9 = 0{,}1$. D'où

$$\hat{q} = \sqrt{\frac{5 \times 10^{-5}}{10^{-1}}} = 2{,}2 \times 10^{-2} = 0{,}022$$

$$\hat{p} = 1 - 0{,}022 = 0{,}978$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. Dans une population, q équivaut à 0,2. Si la valeur sélective de $aa = 0$, quelle sera la valeur de q après 95 générations ?

Solution

La formule à utiliser est ici

$$q^n = \frac{1}{n + 1/q}$$

Donc

$$q^n = 1 / 95 + (1/0{,}2) = 1/100 = 0{,}01$$

PROBLÈMES

1. Quels sont les facteurs qui peuvent modifier la fréquence d'un allèle dans une population ?

2. Chez une population de souris, le locus A comporte deux allèles, (A_1 et A_2). Les résultats d'un test montrent que cette population contient 384 souris de génotype A_1A_1, 210 de A_1A_2, et 260 de A_2A_2. Quelles sont les fréquences de ces deux allèles au sein de la population ?

3. Dans une population panmictique de *Drosophila* élevée au laboratoire, 4 pour cent des mouches se caractérisent par un corps noir (b est le récessif autosomal de couleur noire) et 96 pour cent ont des corps bruns (B confère la couleur normale). En considérant que l'équilibre de Hardy-Weinberg est atteint, quelles sont les fréquences alléliques de B et b et les fréquences des génotypes BB et Bb ?

4. Dans une population, le taux de mutation de D vers d est de 4×10^{-6}. Si à l'heure actuelle $p = 0{,}8$, quelle sera sa valeur après 50.000 générations ?

5. Vous êtes en train d'étudier le polymorphisme des protéines dans une population naturelle d'une certaine espèce, haploïde, à reproduction sexuée. Vous récoltez de nombreuses souches à partir des différentes parties de la région étudiée et réalisez des électrophorèses d'extraits de chacune des souches. Les gels sont colorés sur base d'une réaction spécifique de l'enzyme X et on observe que la population comporte, disons, cinq variants electrophorétiques de l'enzyme X. Vous faites l'hypothèse que ces variants représentent différents allèles du gène de structure codant pour l'enzyme X.

a. Comment démontrer cette hypothèse, à la fois génétiquement et biochimiquement ? (Vous pouvez faire des croisements, des diploïdes, des migrations sur gels, tester des activités enzymatiques, etc.). Décrivez de manière précise les étapes suivies et les conclusions.

b. Trouvez au moins une autre façon d'expliquer l'apparition des différents variants electrophorétiques et dites comment vous seriez à même de distinguer cette possibilité de celle mentionnée ici ?

6. Une étude menée en 1958 dans la ville minière d'Ashibetsu dans la province de Hokkaido, au Japon a montré que les fréquences des groupes sanguins MN pour des personnes prises individuellement et pour des couples mariés se répartissaient comme suit :

Génotype	Nombre d'individus ou de couples
Individus	
L^ML^M	406
L^ML^N	744
L^NL^N	322
Total	1482
Couples	
$L^ML^M \times L^ML^M$	58
$L^ML^M \times L^ML^N$	202
$L^ML^N \times L^ML^N$	190
$L^ML^M \times L^NL^N$	88
$L^ML^N \times L^NL^N$	162
$L^NL^N \times L^NL^N$	41
Total	741

a. Montrez si la population est en équilibre de Hardy-Weinberg ou non en ce qui concerne les types sanguins MN.

b. Montrez si les couples se forment au hasard par rapport aux types sanguins MN.

(Le problème 6 est extrait de J. Kuspira et G.W.Walker, *Genetic : Questions and Problems*. Copyright © 1973 chez McGraw-Hill).

7. Dans le cas d'un caractère lié au sexe, chez une espèce dont le sexe mâle est le sexe hétérogamétique, supposons que les fréquences alléliques pour un locus sont différentes chez les mâles et les femelles.

a. Si la fréquence de A est 0,8 chez les mâles et de 0,2 chez les femelles, montrez l'évolution des fréquences des deux allèles chez les deux sexes, au cours des générations successives.

b. Efforcez-vous d'établir une formule générale exprimant la différence des fréquences alléliques chez les mâles (p) et les femelles (P) à la $n^{ième}$ génération, sachant que leurs valeurs initiales étaient respectivement p_0 et P_0.

8. Considérez les populations dont les génotypes sont donnés dans le tableau suivant :

BU LIAS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Population	*AA*	*Aa*	*aa*
1	1,0	0,0	0,0
2	0,0	1,0	0,0
3	0,0	0,0	1,0
4	0,50	0,25	0,25
5	0,25	0,25	0,50
6	0,25	0,50	0,25
7	0,33	0,33	0,33
8	0,04	0,32	0,64
9	0,64	0,32	0,04
10	0,986049	0,013902	0,000049

a. Quelles sont les populations en équilibre de Hardy-Weinberg ?

b. Quelles sont les valeurs de p et de q pour chaque population ?

c. Dans la population 10, on a pu montrer que le taux de mutation de A vers a est de 5×10^{-6} alors que la mutation en retour est à négliger. Quelle doit être la valeur adaptative du phénotype *aa* ?

d. Dans la population 6, l'allèle a est défavorable; en outre, l'allèle A est incomplètement dominant, de sorte que *AA* a une valeur adaptative optimale, *Aa* une valeur adaptative de 0,8, et *aa* une valeur adaptative de 0,6. Si aucune mutation ne se produit, quelles seront les valeurs de p et de q à la génération suivante ?

9. Le daltonisme est dû à un allèle récessif lié au sexe. Un homme sur 10 est daltonien.

a. Quelle proportion de femmes sont-elles daltoniennes ?

b. Par quel facteur, le daltonisme est-il plus répandu chez l'homme que chez la femme (ou, combien d'hommes souffrant de daltonisme peut-on dénombrer pour chaque femme daltonienne ?)

c. Dans quelle proportion des mariages, le daltonisme affecterait-il la moitié des enfants de chaque sexe ?

d. Dans quelle proportion des mariages, tous les enfants seraient-ils normaux ?

e. Dans une population qui n'est pas en équilibre, la fréquence de l'allèle responsable du daltonisme est de 0,2 chez les femmes et de 0,6 chez les hommes ? Après une génération de panmixie, quelle proportion des descendants femmes sera-t-elle daltonienne ? Quelle sera la proportion chez les hommes ?

f. Que seront les fréquences alléliques chez les hommes et les femmes de la descendance en (e) ?

(Problème 9 fourni par Clayton Person.)

10. Dans une population sauvage de coléoptères de l'espèce X, un rapport 3 : 1 entre élytres brillantes et mates a été déterminé. Ceci prouve-t-il que l'allèle *brillant* est dominant ? (Supposons que les deux états sont dus aux allèles d'un même gène). Sinon, que prouve ce rapport ? Comment résoudriez-vous cette situation ?

11. Il semble clair que la plupart des nouvelles mutations sont désavantageuses. Pourquoi ?

12. La plupart des mutations sont récessives par rapport aux caractères du type sauvage. Parmi ces rares mutations qui apparaissent comme dominantes chez *Drosophila*, la majorité sont associées à des aberrations chromosomiques ou ne peuvent être séparées d'aberrations chromosomiques. Comment expliquer que le type sauvage est habituellement dominant ?

13. Dix pour cent des hommes d'une population panmictique sont daltoniens. Un groupe de 1000 personnes de cette population immigre sur une île du Pacifique Sud, habitée déjà par 1000 personnes et où 30 pour cent des hommes sont daltoniens. En supposant que l'équilibre de Hardy-Weinberg s'applique aussi bien au cas des deux populations de départ avant l'immigration que dans la population mélangée tout juste après l'immigration, quelle fraction des hommes et des femmes peut-elle être considérée comme étant daltonienne dans la génération suivant immédiatement l'arrivée des immigrants ?

14. En utilisant les diagrammes de généalogie, quelle est la probabilité d'homozygotie dans la descendance **a.** de croisements parents-descendance ; **b.** de croisements entre cousins du premier degré; **c.** de croisements tante-neveu ou oncle-nièce.

15. Une étude des tribus indiennes en Arizona et au Nouveau Mexique a montré que les albinos étaient complètements absents ou du moins très rares dans la plupart des tribus (il y a un albinos pour 20.000 Nord-Américains Caucasiens). Cependant, dans trois populations d'Indiens, la fréquence des albinos est exceptionnellement élevée : un pour 277 Indiens d'Arizona; un sur 140 Indiens Jemez au Nouveau-Mexique; et un sur 247 Indiens Zuni au Nouveau-Mexique. Ces trois populations sont culturellement apparentées mais ne le sont pas par la langue. Quels facteurs envisager pour expliquer la fréquence élevée d'albinos dans ces trois tribus ?

16. Dans une population animale, 20 pour cent des individus sont *AA*, 60 pour cent *Aa*, et 20 pour cent *aa*. Quelles sont les fréquences des allèles ? Dans cette population, les croisements se réalisent toujours *entre phénotypes qui se ressemblent*, mais se font au hasard au sein d'un phénotype. Quelles sont les fréquences des génotypes et des allèles qui se manifesteront à la génération suivante ? De tels cas *d'homogamie* sont répandus chez les populations animales. Un autre type de croisement préférentiel se présente lorsque seuls les individus qui ne se ressemblent pas s'associent; répondez à la question ci-dessus dans ce cas précis. Quel sera le résultat final après de nombreuses générations de croisements des deux types ?

17. Chez *Drosophila*, une souche isolée à partir d'une population naturelle présente en moyenne 36 soies abdominales. En sélectionnant pour les croisements les mouches possédant un plus grand nombre de soies, la moyenne s'est élevée à 56 après 20 générations. Quelle est l'origine de cette flexibilité génétique ? Le stock à 56 soies est très peu fertile, de sorte que la sélection fut relâchée pour plusieurs générations et que le nombre de soies décroît jusqu'à environ 45. Pourquoi ne décroît-il pas jusqu'à 36 ? Lorsque la sélection est à nouveau appliquée, on atteint rapidement 56 soies, mais cette fois le stock n'est plus stérile. Expliquez comment cette situation peut se produire ?

18. Les valeurs adaptatives de trois génotypes sont $W_{AA} = 0,9$; $W_{Aa} = 1,0$; $W_{aa} = 0,7$.

a. Si la fréquence allélique de la population au départ est de $p = 0,5$, quelle est la valeur de p à la génération suivante ?

b. Quelle est la fréquence allélique d'équilibre attendue?

19. Les individus *AA* et *Aa* sont de fertilité égale. Si 0,1 pour cent de la population est *aa*, quelle pression de sélection s'exerce-t-elle vis-à-vis de *aa* si le taux de mutation de *A* vers *a* est de 10^{-5}?

20. Le gène *B* est dominant, autosomal et défavorable. La fréquence des individus affectés par ce gène est $4,0 \times 10^{-6}$. Le pouvoir reproducteur de ces individus est environ 30 pour cent de celui des individus normaux. Estimez μ, le taux avec lequel *b* mute en son allèle défavorable *B*.

21. Sur un total de 31 enfants nés d'unions père-fille, six décédèrent dès la plus tendre enfance, 12 étaient très anormaux et décédèrent au cours de l'enfance et 13 étaient normaux. Sur la base de cette information, calculez grossièrement combien de gènes récessifs létaux sont représentés, en moyenne, dans nos génomes humains. Par exemple, si la réponse est 1, une fille aurait alors 50 pour cent de chance d'être porteuse d'une combinaison létale et la probabilité que l'union produise une combinaison létale serait de $1/2 \times 1/4 = 1/8$. (Donc, très nettement 1 n'est pas la bonne réponse). Envisagez aussi la possibilité de mortalités *in utero* qui ne sont pas détectées chez de telles unions. Comment ceci affecterait-il vos résultats ?

22. Nous pouvons définir dans une population le **fardeau sélectif total** dû à la présence de gènes défavorables comme la perte de valeur adaptative par individu concerné (s) multiplié par la fréquence des individus concernés (q^2). Donc

$$\text{le fardeau génétique} = sq^2$$

a. Supposons qu'une population soit en équilibre entre la mu-tation et la sélection d'un gène récessif défavorable, où s = 0,5 et m = 10^{-5}. Quelle est la fréquence à l'équilibre du gène ? Quel est le fardeau génétique ?

b. Supposons que les individus de la population soient irradiés de telle manière que le taux de mutation double. Quel sera la nouvelle fréquence à l'équilibre du gène ? Quel sera le nouveau fardeau génétique ?

c. Si nous ne modifions pas le taux de mutations mais que nous diminuons l'intensité de la sélection à $s = 0,3$ au lieu de 0,5, quelles sont les conséquences sur la fréquence à l'équilibre et sur le fardeau génétique ?

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CHAPITRE

27

Génétique quantitative

Variation quantitative de la couleur, du diamètre et du nombre de pièces florales chez les fleurs composées de *Gaillardia pulchella* (J. Heywood, Journal of Heredity, May/June 1986)

CONCEPTS-CLÉS

- Dans les populations naturelles, la variation se présente pour la plupart des caractères sous la forme d'une gamme continue de phénotypes plutôt que d'une série de classes phénotypiques distinctes. En d'autres termes, la variation est d'ordre quantitatif, et non qualitatif.
- L'analyse génétique mendélienne est très difficile à appliquer à un tel continuum de phénotypes, qui se prête plutôt à l' analyse statistique.
- Une tâche majeure de la génétique quantitative est de déterminer comment les modes d'interaction des gènes avec leur environnement contribuent à façonner la distribution d'un caractère quantitatif donné.
- La variation génétique à la base de la distribution d'un caractère continu peut être le résultat de la ségrégation, soit d'un simple locus, soit de nombreux loci dont les effets et les interactions se cumulent au niveau du phénotype.
- Le rapport estimé de la variation génétique à la variation due au milieu *n'est pas* une mesure de la contribution relative des gènes et de leur environnement dans l'élaboration du phénotype.
- Des estimations de la variance génétique et de la variance due à l'environnement sont propres à la population envisagée et à la série particulière de milieux au sein desquels les estimations sont établies.

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

Le but ultime de la génétique réside dans l'analyse du génotype des organismes. Cependant le génotype ne peut être identifié - et donc étudié - qu'à travers son phénotype. Nous reconnaissons deux génotypes comme différents parce que les phénotypes des individus porteurs sont différents:L'expérimentation en génétique dépend donc de l'existence d'une relation simple entre le génotype et le phénotype. C'est pourquoi l'étude des séquences d'ADN est si importante puisqu'elle nous permet de lire un génotype sans hésitation à partir du plus fondamental de tous les phénotypes. En général, nous espérons attribuer un phénotype distinct à chaque génotype et un seul génotype à chaque phénotype. Dans le pire des cas, lorsqu'un allèle exerce une dominance complète, il peut être nécessaire de recourir à un croisement génétique pour distinguer l'hétérozygote de l'homozygote. Si possible, les généticiens évitent d'étudier des gènes à pénétrance partielle et expressivité incomplète (page ...) du fait de la difficulté de tirer des conclusions génétiques à partir de tels caractères. Imaginez la difficulté (voire l'impossibilité) dans laquelle se serait trouvé Benzer pour analyser la structure fine du gène chez le phage si le seul effet des mutants rII aurait été de pouvoir se développer sur la souche *E. coli* K presque aussi bien que le type sauvage de phages (voir page 361). L'étude de la génétique telle que relatée dans les chapitres précédents se confond en grande partie avec celle des substitutions d'allèles qui provoquent des modifications *qualitatives* chez l'organisme en cause.

Force nous est de constater que la variation au sein des organismes est le plus souvent quantitative et non qualitative. Des plantes de blé dans un champ ou des asters sauvages sur le bord d'une route ne se distribuent pas en catégories distinctes de taille élevée ou petite pas plus que les hommes ne se répartissent de manière tranchée en «blancs « ou en «noirs». La taille, le poids, la forme, la couleur, l'activité métabolique, le taux de reproduction et le comportement sont des caractéristiques dont la variation est plus ou moins continue dans une certaine gamme (Figure 27-1). Même si le caractère se décrit intrinsèquement par un nombre (comme le nombre de facettes de l'oeil ou de soies chez *Drosophila*), le nombre de classes discernables peut être si élevé que la variation apparaît comme quasi continue. Si nous considérons des cas **extrêmes** - disons une plante de maïs de 240 cm de haut et une autre de 90 cm - leur croisement ne produira pas un résultat de type mendélien. Ce croisement donnera des plantes d'une taille d'environ 180 cm, mais avec une nette variation parmi les descendants du croisement. La F_2 issue de l'autofécondation de la F_1 ne se distribuera pas en deux ou trois classes de taille distincte dans des rapports de type 3:1 ou 1:2:1. Au contraire, la F_2 montrera une distribution continue de tailles d'un extrême parental à l'autre. Ce type de résultat ne constitue pas une exception, mais la règle pour nombre de caractères chez la plupart des espèces. Mendel obtint des résultats relativement simples grâce à l'usage qu'il fit de variétés horticoles de pois différant les unes des autres par de simples allèles à effets phénotypiques tranchés. Si Mendel avait mené des expériences sur la variation naturelle des mauvaises herbes de son jardin au lieu de variétés de pois, il n'aurait sans doute jamais découvert les lois qui portent son nom. D'une façon générale, des caractères comme la taille, la forme, la couleur, l'activité physiologique et le comportement ne ségrègent pas d'une manière simple dans les descendances de croisements.

Toutefois, le fait que de nombreux caractères phénotypiques varient d'une façon continue ne signifie pas que cette variation résulte de mécanismes génétiques différents de ceux établis pour les gènes mendéliens considérés jusqu'ici. La continuité du phénotype est en fait le résultat de deux phénomènes. Tout d'abord, chaque génotype ne détermine pas une expression phénotypique unique mais bien une norme de réaction (voir chapitre 1) qui couvre une large gamme de phénotypes. Il en résulte que les différences phénotypiques entre catégories de génotypes s'estompent et nous ne sommes plus capables d'associer sans ambiguïté un phénotype donné à un génotype particulier. Deuxièmement, un phé-

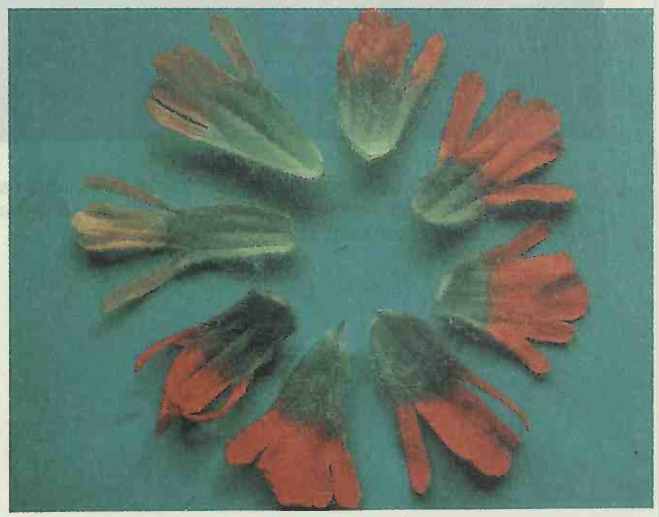


Figure 27-1. Hérédité quantitative de la couleur de la bractée chez *Castilleja hispida* («Indian paintbrush»). La photographie de gauche montre les extrêmes de la gamme des couleurs, et celle de droite fournit des exemples de toute la gamme phénotypique.

notype donné peut être influencé par des allèles de loci pouvant s'assortir de différentes manières. Supposons, par exemple, que cinq loci d'importance égale soient impliqués dans un caractère donné et que chaque locus possède deux allèles (appelons-les + et –). Pour la simplicité, supposons aussi qu'il n'y a pas de dominance et qu'un allèle + ajoute une unité au caractère alors qu'un allèle - ne le modifie en rien. Ceci implique que $3^5 = 243$ génotypes différents sont représentés (trois génotypes possibles (+ +,+ –, et – –) pour chacun des cinq loci) , depuis

+ + + + +		+ + + + +		– – – – –
	en passant par		jusqu'à	
+ + + + +		– – – – –		– – – – –

mais 11 classes seulement de phénotypes (10, 9, 8, ..., 0), de nombreux génotypes ayant le même nombre d'allèles + et d'allèles –. Par exemple, bien qu'un seul génotype comportant 10 allèles + et donc d'une valeur phénotypique de 10 soit représenté, il y a 51 génotypes différents ayant tous 5 allèles + et 5 allèles –, par exemple

+ + + + –		+ + – + –
	et	
+ – – – –		+ + – – –

Donc, de nombreux génotypes différents peuvent présenter le même phénotype moyen. Simultanément, suite à la variation du milieu, deux individus de même génotype peuvent ne pas avoir le même phénotype. Ce manque de correspondance entre génotype et phénotype obscurcit le mécanisme mendélien sous-jacent. Si nous ne pouvons étudier le comportement des facteurs mendéliens qui contrôlent directement de semblables caractères, comment pouvons-nous en poursuivre l'analyse génétique ?

Grâce à des techniques expérimentales établies, les généticiens sont à même de répondre à des questions sur le déterminisme génétique d'un caractère à variation continue dans une population (la taille dans une population humaine, par exemple). Ces questions sont à la base de l'étude de la *génétique quantitative* - l'étude de la génétique de caractères à variation continue. A savoir :

1. La variation observée du caractère est-elle d'une façon ou d'une autre influencée par la variation génétique ? La ségrégation d'allèles dans la population est-elle responsable des différences dans le caractère, ou bien toute cette variation n'est-elle que le résultat d'une variation du milieu et de fluctuations fortuites au cours du développement (pages 14-17) ?

2. Si une variation génétique existe, quelles sont les normes de réaction des différents génotypes ?

3. Quelle est l'importance de la variation génétique dans la variation phénotypique totale ? Les normes de réaction et les effets du milieu sont-ils tels que presque toute la variation résulte de différences de milieu et de perturbations dans le développement, ou bien la variation génétique est-elle prédominante ?

4. De nombreux loci (ou seulement quelques-uns) affectent- ils le caractère ? Comment sont-ils répartis dans le génome?

5. Comment les différents loci interagissent-ils pour influencer le caractère? A-t-on affaire à des cas de dominance ou d'épistasie (interaction de gènes situés à des loci différents)?

6. Sommes-nous en présence d'hérédité non-nucléaire (y a-t-il par exemple, un effet maternel) ?

Finalement, ces questions se jutifient par la possibilité de prédire quels types de descendance seront produits par croisement entre les différents phénotypes.

Le degré de précision avec lequel ces questions peuvent être formulées et résolues est très variable. Chez des organismes expérimentaux, il est relativement simple d'établir si une influence génétique s'exerce, mais la localisation de ces gènes (même approximative) est extrêmement laborieuse. Chez l'homme, par contre, il est très difficile de répondre à la question de savoir si une influence génétique s'exerce et ceci pour la plupart des caractères, en raison de la quasi impossibilité de séparer les effets du milieu des effets génétiques chez un organisme qui ne peut pas être soumis à l'expérience. Il en résulte que de nombreuses données sont connues sur la génétique du nombre de soies chez *Drosophila*, alors que pratiquement rien n'est établi de la génétique de caractères humains complexes, si ce n'est qu'un petit nombre d'entre eux (comme la couleur de la peau) est clairement soumis à l'influence de gènes tandis que d'autres (comme les langues parlées) ne le sont pas. Ce chapitre a pour but de développer les concepts statistiques et génétiques fondamentaux nécessaires pour répondre aux questions posées ci-dessus ainsi que de donner quelques exemples de leur application.

Quelques notions de statistique

Pour répondre aux questions concernant les types de variation génétique les plus courants, nous devons d'abord faire connaissance avec les outils statistiques propres à la génétique quantitative.

Distributions

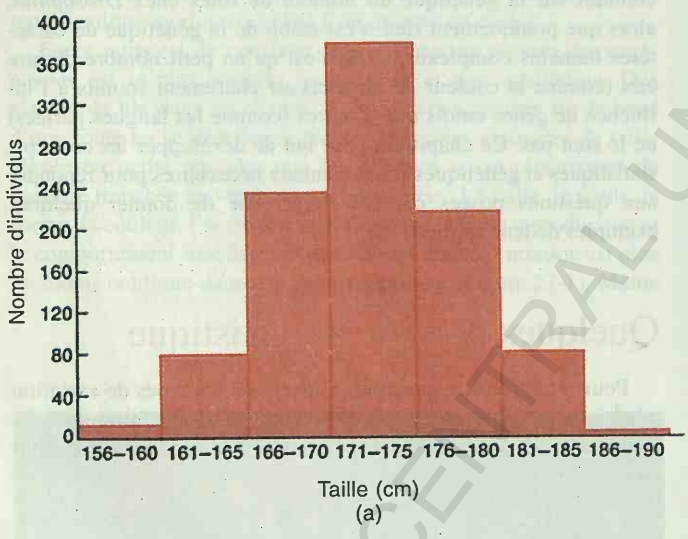
Le résultat d'un croisement impliquant un caractère mendélien peut être décrit sous forme de proportions dans la descendance entre individus appartenant à des classes phénotypiques distinctes, ou simplement en termes de présence ou d'absence d'une classe. Par exemple, on peut s'attendre à ce qu'un croisement entre une plante à fleurs rouges et une plante à fleurs blanches fournisse des plantes toutes à fleurs rouges ou, s'il s'agit d'un croisement en retour, une moitié de fleurs rouges et une moitié de fleurs blanches. Mais la description de caractères quantitatifs doit faire appel à un autre concept, celui de la *distribution statistique*. Si la taille d'un grand nombre d'étudiants du sexe mâle est mesurée à 5 centimètres près, elle variera (disons entre 145 et 195 cm), mais le plus grand nombre d'individus se rangera dans les catégories intermédiaires (disons entre 170 et 180 cm) plutôt qu'au niveau des extrêmes.

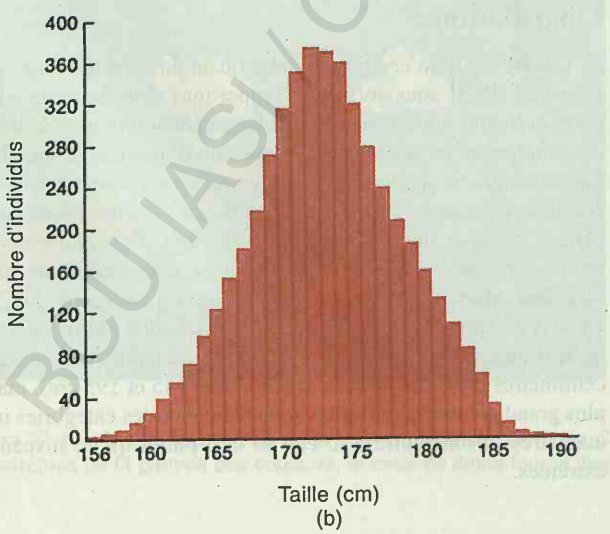
Si chacune des classes de mesures est représentée par une barre dont la hauteur est proportionnelle au nombre d'individus par classe, les résultats peuvent se représenter comme sur la figure 27-2a. Un graphique de ce type associant le nombre d'individus observés par classe de mesure porte le nom d'**histogramme de fréquences**. Supposons à présent que cinq fois plus d'individus soient mesurés, chaque fois au centimètre près. Les classes de la figure 27-2a se subdivisent pour donner un histogramme du type montré à la figure 27-2b. Si nous poursuivons ce processus en affinant la mesure tout en augmentant proportionnellement le nombre d'individus mesurés, l'histogramme tendra vers une forme continue comme la figure 27-2c le montre, et représentera la **fonction de distribution** des tailles de la population.

Il est évident que cette courbe continue est une courbe idéale, puisqu'aucune mesure ne peut être prise avec une précision infinie ou concerner un nombre illimité d'individus. En outre, la variable mesurée peut elle-même être intrinsèquement discontinue dans le cas où elle représente la somme d'un certain nombre d'objets distincts comme les facettes de l'oeil ou les soies. Néanmoins il peut être commode de développer nos concepts en nous basant sur cette situation légèrement idéalisée, plutôt que sur l'histogramme brut, beaucoup moins maniable (figure 27-2a). Nous ne devrons toutefois pas oublier que la fonction de distribution représente bien une idéalisation.

Le Mode. La plupart des distributions de phénotypes ressemblent à celles de la figure 27-2 : une classe unique caractérisée par la fréquence la plus élevée, le **mode**, se situe près du milieu de la distribution, les fréquences diminuant de part et d'autre. Des exceptions par rapport à cette configuration se rencontrent cependant. La figure 27-3a décrit la distribution très asymétrique du poids de graines chez la plante *Crinum longifolium*. La figure 27-3b représente une distribution **bimodale** de la probabilité de survie des larves chez des homozygotes pour le deuxième chromosome de *Drosophila willistoni*.

Une distribution bimodale peut indiquer que la population étudiée pourrait être en fait considérée comme un mélange de deux populations, chacune possédant son propre mode. A la figure 27-3b, le mode de gauche représente probablement des mutations à un seul locus, à effets marqués, très dommageables à l'état homozygote, mais dont les effets ne se font pas sentir à l'état hétérozygote qui est la situation habituelle dans les populations naturelles. Par contre le mode de droite fait partie de la distribution de modifications à faibles effets et de viabilité normale.





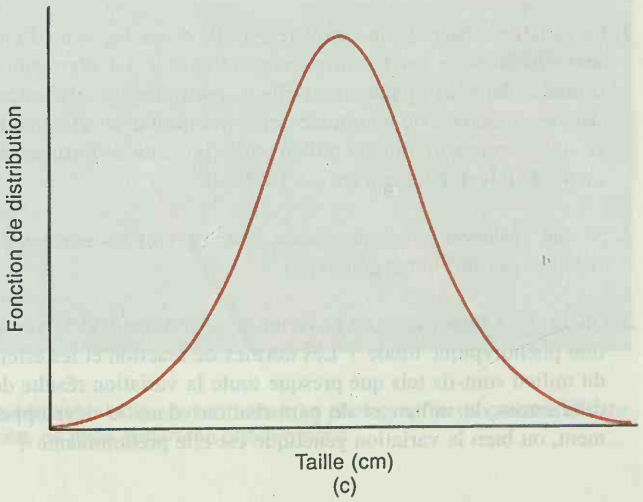


Figure 27-2. Graphique de distribution des fréquences de la taille des étudiants. (a) Histogramme établi sur base d'intervalles de classes de 5 cm. (b) Histogramme établi sur base d'intervalles de classes d' 1 cm. (c) Graphique d'une distribution continue.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

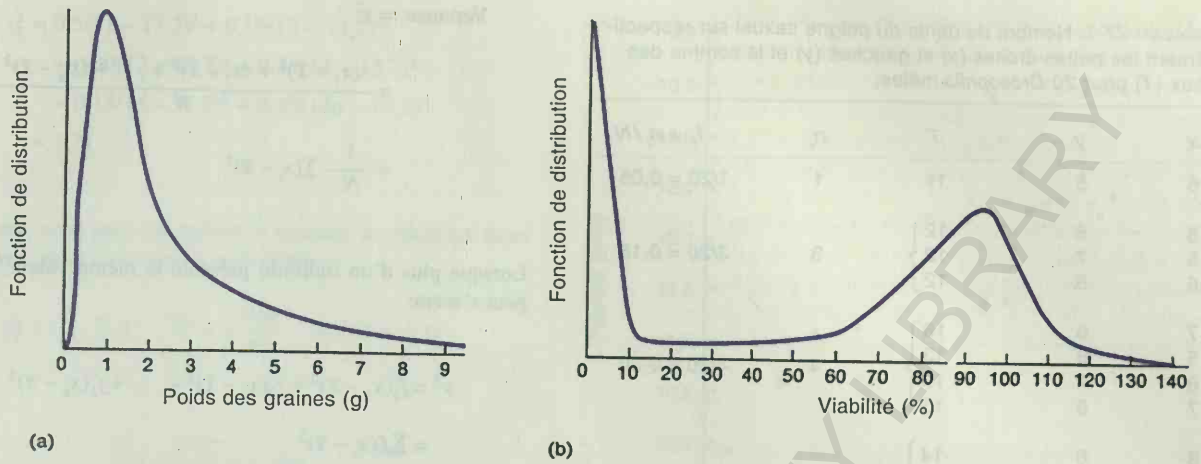


Figure 27-3. Fonctions de distribution asymétrique. (a) Distribution asymétrique du poids des graines chez *Crinum longifolium*. (b) Distribution bimodale du taux de survie chez *Drosophila willistoni*, en pourcentage du taux de survie standard. (Selon S. Wright, *Evolution and the Genetics of Populations*, Vol. I. Copyright 1968 by University of Chicago Press, 1968).

La Moyenne. Une information complète sur la distribution d'un phénotype dans une population ne peut être obtenue qu'en spécifiant la fréquence de chaque classe mesurée, quoique la majeure partie de l'information puisse se réduire à deux paramètres statistiques. Premièrement, il est nécessaire de mesurer la répartition de la distribution le long de l'axe des mesures (par exemple, les mesures individuelles ont-elles tendance à se grouper autour de 100 ou de 200 cm ?). Une possibilité consiste à mesurer la classe la plus commune, le mode. A la figure 27-2b, le mode est de 172 cm; pour les étudiantes, ce serait environ 6 cm en moins. Une autre mesure de la répartition de l'ensemble de mesures est la moyenne arithmétique, ou **moyenne**. La moyenne d'une série de mesures ($\bar{x}$) est simplement la somme de toutes les mesures (x_i) divisée par le nombre de mesures dans l'échantillon (N) :

$$\text{Moyenne} = \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \ldots + x_N}{N} = \frac{1}{N}\sum x^i$$

où Σ représente la somme et x_i la i^{ième} mesure.

Dans le cas d'un échantillon nombreux, la même valeur mesurée apparaîtra plus d'une fois puisque plusieurs individus présenteront la même valeur dans les limites d'exactitude de l'instrument de mesure. Dans un tel cas, $\bar{x}$ peut être récrit comme la somme de toutes les valeurs mesurées, chacune étant pondérée par la fréquence avec laquelle elle apparaît dans la population. Pour un nombre total N d'individus mesurés, supposons que n_1 se rangent dans la classe de valeur x_1, que n_2 se rangent dans la classe de valeur x_2, et ainsi de suite, de telle sorte que $\Sigma\, n_i = N$. Si nous désignons f_i comme la **fréquence relative** de la i^{ième} classe de mesures, de telle sorte que

$$f_i = \frac{n_i}{N}$$

nous pouvons réécrire la moyenne comme

$$\bar{x} = f_1x_1 + f_2x_2 + \ldots + f_kx_k = \Sigma f_ix_i$$

où x_i est égal à la valeur de la i^{ième} classe de mesures.

Appliquons ces méthodes de calcul aux donnés du tableau 27-1 qui concerne le nombre de soies dentées des peignes sexuels respectivement sur les pattes anterieures droites (x) et gauches (y) et sur l'ensemble des pattes (T = x + y) de 20 *Drosophila*. En ne considérant pour le moment que la somme des deux pattes T, le nombre moyen de dents $\bar{T}$, est de :

$$\bar{T} = \frac{11 + 12 + 12 + 12 + 13 + \ldots + 15 + 16 + 16}{20}$$
$$= \frac{274}{20}$$
$$= 13{,}7$$

Ou bien, en utilisant les fréquences relatives des différentes valeurs mesurées :

$$\bar{T} = 0{,}05(11) + 0{,}15(12) + 0{,}20(13) + 0{,}35(14) + 0{,}15(15) + 0{,}10(16)$$
$$= 13{,}7$$

La Variance. Une deuxième caractéristique d'une distribution concerne l'amplitude de sa dispersion autour de la classe centrale. Deux distributions de même moyenne peuvent différer notablement par la façon dont les mesures sont groupées autour de la moyenne. La mesure la plus répandue de la dispersion est la **variance** qui est la moyenne des carrés des écarts des observations par rapport à la moyenne, ou

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tableau 27-1. Nombre de dents du peigne sexuel sur respectivement les pattes droites (x) et gauches (y) et la somme des deux (T) pour 20 *Drosophila* mâles.

x	y	T	n_i	$f_i = n_i/N$
6	5	11	1	1/20 = 0,05
6	6	12		
5	7	12	3	3/20 = 0,15
6	6	12		
7	6	13		
5	8	13		
6	7	13	4	4/20 = 0,20
7	6	13		
8	6	14		
6	8	14		
7	7	14		
7	7	14	7	7/20 = 0,35
7	7	14		
6	8	14		
8	6	14		
8	7	15		
7	8	15	3	3/20 = 0,15
6	9	15		
8	8	16		
7	9	16	2	2/20 = 0,10

N = 20

$\bar{x} = 6,25$ $\quad s_x^2 = 0,8275$ $\quad s_x = 0,9096$

$\bar{y} = 7,05$ $\quad s_y^2 = 1,1475$ $\quad s_y = 1,0722$

$\bar{T} = 13,70$ $\quad s_T^2 = 1,71$ $\quad s_T = 1,308$

cov $xy = -0,1325$

$r_{xy} = -0,1360$

$$\text{Variance} = s^2$$

$$= \frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \ldots + (x_N - \bar{x})^2}{N}$$

$$= \frac{1}{N} \Sigma (x_i - \bar{x})^2$$

Lorsque plus d'un individu présente la même valeur, la variance peut s'écrire

$$s^2 = f_1(x_1 - \bar{x})^2 + f_2(x_2 - \bar{x})^2 + \ldots + f_k(x_k - \bar{x})^2$$

$$= \Sigma f_i (x_i - \bar{x})^2$$

Pour éviter de soustraire chaque valeur de x une à une de la moyenne, nous utiliserons une formule alternative algébriquement identique à l'équation précédente :

$$s^2 = \frac{1}{N} \Sigma x_i^2 - \bar{x}^2$$

Comme la variance s'exprime en unités au carré (des centimètres carrés, par exemple), on utilise la racine carrée de la variance qui s'exprime donc dans les mêmes unités que la grandeur utilisée. Cette racine carrée de la mesure de la dispersion se nomme l'**écart type** de la distribution:

$$\text{Ecart type} = s = \sqrt{\text{variance}} = \sqrt{s^2}$$

Les données du tableau 27-1 peuvent être utilisées à titre d'exemple pour ce type de calculs.

$$s_T^2 = \frac{(11 - 13,7)^2 + (12 - 13,7)^2 + 12 - 13,7)^2}{20}$$

$$\frac{+ \ldots + (15 - 13,7)^2 + 16 - 13,7)^2}{20}$$

$$= \frac{34,20}{20} = 1,71$$

ou bien

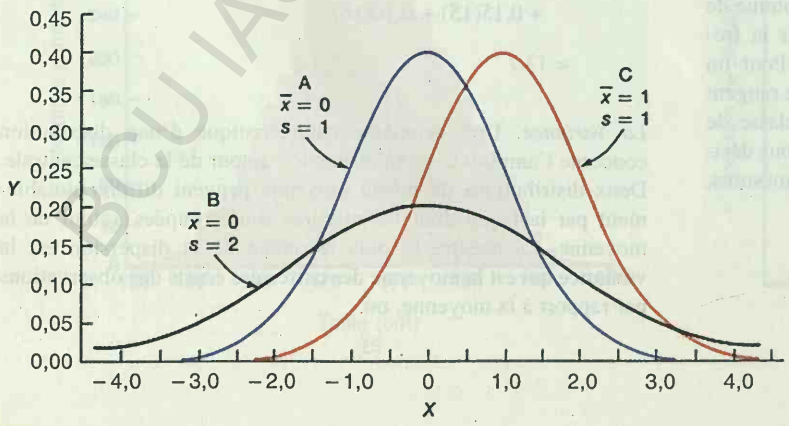


Figure 27-4. Trois fonctions de distribution, deux d'entre elles ayant la même moyenne et deux le même écart type.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$s_T^2 = 0{,}5(11 - 13{,}7)^2 + 0{,}15(12 - 13{,}7)^2 + 0{,}20(13 - 13{,}7)^2 + 0{,}35(14 - 13{,}7)^2 + 0{,}15(15 - 15{,}7)^2 + 0{,}10(146 - 13{,}7)^2 = 1{,}71$$

Finalement, nous pouvons utiliser la formule de calcul qui nous évite de devoir relever les écarts individuels:

$$s_T^2 = \frac{1}{N} \Sigma T_i^2 - \overline{T}^2 = \frac{3788}{20} - 187{,}69 = 1{,}71$$

et

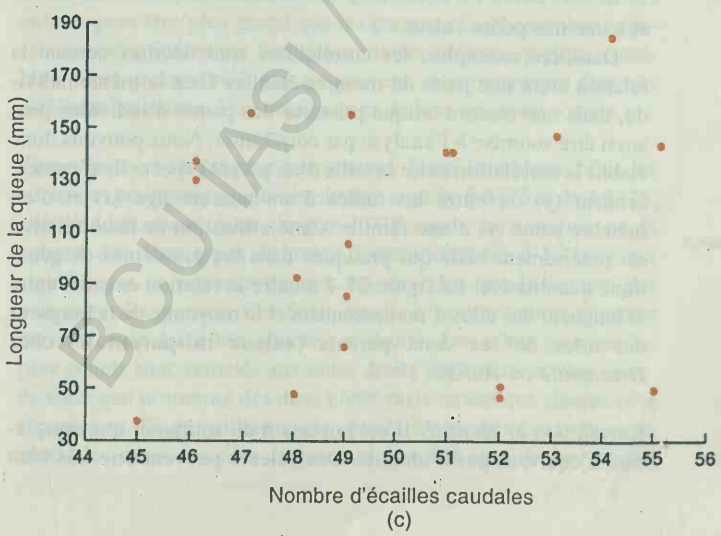
$$s = \sqrt{1{,}71} = 1{,}308$$

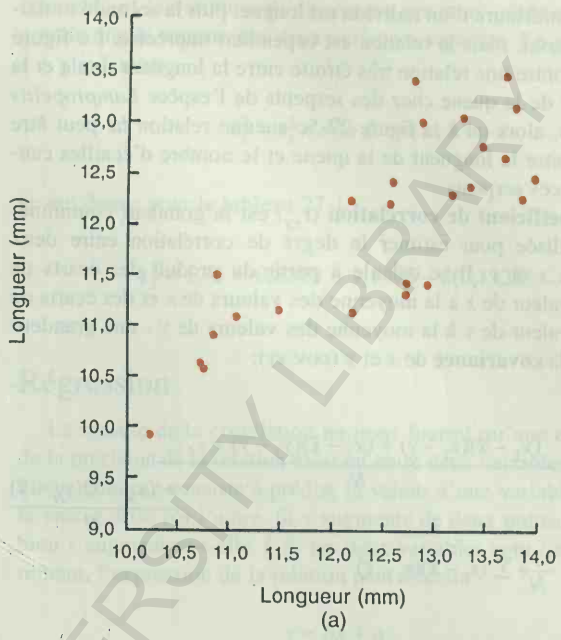
La figure 27-4 montre deux distributions de même moyenne mais à écarts types différents (courbes A et B) ainsi que deux distributions à même écart type mais dont les moyennes sont différentes (courbes A et C).

La moyenne et la variance d'une distribution ne la décrivent cependant pas complètement. Par exemple, elles ne permettent pas de distinguer une distribution symétrique d'une distribution asymétrique. Nous pouvons même établir des distributions symétriques à moyenne et variance identiques mais dont la forme est quelque peu différente; néanmoins dans la plupart des problèmes de génétique quantitative, la moyenne et la variance suffisent à caractériser une distribution.

Covariance et Corrélation

Une autre notion statistique utilisée en génétique quantitative a trait à l'association ou mieux **corrélation** entre variables. Par suite d'un ensemble de causes complexes, de nombreuses variables dans la nature varient de concert mais de manière imparfaite ou approximative. La figure 27-5a en fournit un exemple, en considérant les longueurs de deux dents données chez plusieurs individus d'un mammifère fossile, *Phenacodus primaevis*. Plus la première





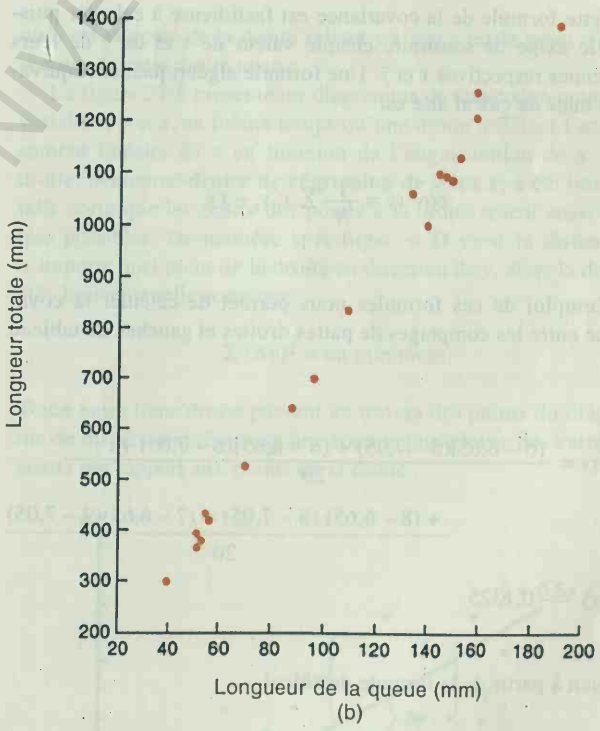


Figure 27-5. Diagramme de dispersion établis pour des couples de variables. (a) Relation entre les longueurs de la première et de la deuxième molaire inférieure (M_1 et M_2) chez le mammifère fossile *Phenacodus primaevis*.Chaque point représente les valeurs mesurées de M_1 et M_2 pour chaque individu. (b) Relation entre la longueur de la queue et celle du corps de 18 individus chez l'espèce de serpent *Lampropeltis polyzona*. (c) Nombre d'écailles caudales et longueur de la queue mesurés chez les mêmes 18 serpents qu'en (b).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

molaire inférieure d'un individu est longue, plus la seconde molaire l'est aussi, mais la relation est cependant imprécise. La figure 27-5b montre une relation très étroite entre la longueur totale et la longueur de la queue chez des serpents de l'espèce *Lampropeltis polyzona*, alors qu'à la figure 27-5c aucune relation ne peut être établie entre la longueur de la queue et le nombre d'écailles caudales de ces serpents.

Le **coefficient de corrélation** (r_{xy}) est la grandeur communément utilisée pour estimer le degré de corrélation entre deux variables x et y. Il se calcule à partir du produit des écarts de chaque valeur de x à la moyenne des valeurs de x et des écarts de chaque valeur de y à la moyenne des valeurs de y - une grandeur appelée la **covariance** de x et y (cov xy):

$$\text{cov } xy = \frac{(x_1 - \bar{x})(y_1 - \bar{y}) + (x_2 - \bar{x})(y_2 - \bar{y}) + \ldots + (x_N - \bar{x})(y_N - \bar{y})}{N}$$

$$= \frac{1}{N} \Sigma (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

Cette formule de la covariance est fastidieuse à calculer puisqu'elle exige de soustraire chaque valeur de x et de y de leurs moyennes respectives $\bar{x}$ et $\bar{y}$. Une formule algébriquement équivalente mais de calcul aisé est

$$\text{cov } xy = \frac{1}{N} \Sigma x_i y_i - \bar{x}\bar{y}$$

L'emploi de ces formules nous permet de calculer la covariance entre les comptages de pattes droites et gauches du tableau 27-1.

$$\text{cov } xy = \frac{(6 - 6{,}65)(5 - 7{,}05) + (6 - 6{,}65)(6 - 7{,}05) + \ldots + (8 - 6{,}65)(8 - 7{,}05) + (7 - 6{,}65)(9 - 7{,}05)}{20}$$

$$\text{cov } xy = -0{,}1325$$

ou bien à partir de la formule de calcul

$$\text{cov } xy = \frac{1}{N} \Sigma xy - \bar{x}\bar{y}$$

$$= \frac{(6)(5) + (6)(6) + \ldots + (8)(8) + (7)(9)}{20} - (6{,}65)(7{,}05)$$

$$= -0{,}1325$$

$$\text{Coefficient de corrélaon} = r_{xy} = \frac{\text{cov } xy}{s_x s_y}$$

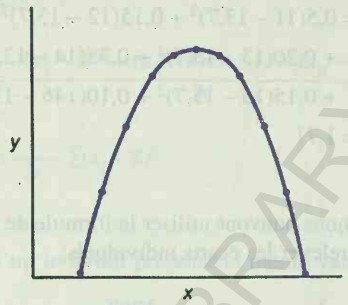


Figure 27-6. Une parabole.Chaque valeur de y peut se prédire à partir de la valeur de x, sans qu'il y ait une corrélation linéaire entre elles.

Dans la formule permettant de calculer la corrélation, les produits des écarts sont divisés par le produit des écarts types de x et de y (s_x et s_y). Cette normalisation par les écarts types a pour effet de rendre r_{xy} un nombre sans dimensions, indépendant des unités utilisées pour mesurer x et y. Ainsi défini, r_{xy} varie de -1, ce qui signifie une relation négative parfaitement linéaire entre x et y, à +1, ce qui indique une relation positive parfaitement linéaire entre x et y. Si $r_{xy} = 0$, il n'y a pas de relation linéaire entre les deux variables. Cependant, relevons que parfois lorsqu'il n'y a pas de relation *linéaire* entre deux variables mais qu'une relation régulière *non-linéaire* existe entre elles, la valeur d'une variable peut parfaitement se prédire à partir de celle de l'autre. Considérons, par exemple, la parabole de la figure 27-6. Les valeurs de y sont parfaitement prévisibles à partir de celles de x; toutefois $r_{xy} = 0$ puisque en moyenne sur l'ensemble des valeurs de x, les valeurs les plus élevées ne sont associées ni aux valeurs les plus grandes ni aux valeurs les plus basses de y. Les données montrées en (a), (b), et (c) de la figure 27-5 se caractérisent par des valeurs de r_{xy} égales respectivement à 0,82, 0,99 et 0,10. Dans l'exemple des dents des peignes sexuels du tableau 27-1, la correlation entre pattes gauches et droites équivaut à

$$r_{xy} = \frac{\text{cov } xy}{\sqrt{s_x^2 s_y^2}} = \frac{-0{,}1325}{\sqrt{(0{,}8275)(1{,}1475)}} = -0{,}1360$$

et a une très petite valeur.

Dans, ces exemples, les corrélations sont décrites comme la relation entre une paire de mesures établies chez le même individu, mais une mesure unique prise sur des paires d'individus peut aussi être soumise à l'analyse par corrélation. Nous pouvons donc établir la corrélation entre la taille d'un parent (x) et celle d'un descendant (y) ou entre les tailles d'un membre âgé (x) et d'un membre jeune (y) d'une famille. Cette utilisation de la corrélation est précisément celle qui pratiquée dans les problèmes de génétique quantitative. La figure 27-7 montre la relation existant entre la longueur des ailes d'un descendant et la moyenne de la longueur des ailes de ses deux parents (**valeur mi-parentale**) chez *Drosophila* (= +0,83).

Corrélation et Identité. Il est important de souligner que corrélation n'équivaut pas à identité. Des valeurs peuvent être très bien

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

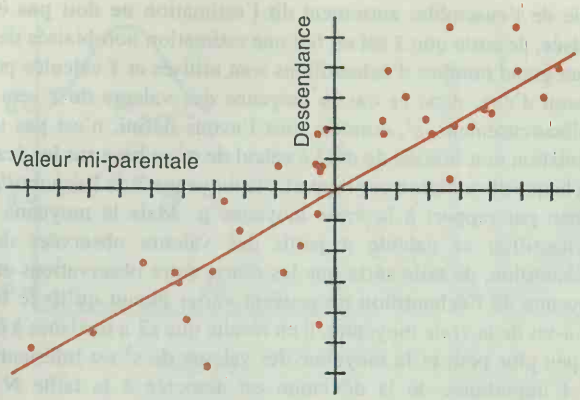


Figure 27-7. Relation entre les longueurs des ailes d'une série de *Drosophila* et la moyenne des longueurs des ailes de leurs deux parents (Selon D. Falconer, *Quantitative Genetics*, Copyright 1981 by Longman Group Limited.)

corrélées sans être identiques. Les variables x et y au sein des couples

x	y
1	22
2	24
3	26

sont parfaitement corrélées ($r = +1{,}0$) quoique chaque valeur de y est environ plus grande de 20 unités que la valeur correspondante de x. Deux variables sont parfaitement corrélées si, pour une augmentation d'une unité de l'une, se produit une augmentation constante de l'autre (ou une diminution constante si r est négatif). L'importance de la différence entre corrélation et identité apparaît lorsque l'on considère l'effet de l'environnement sur les caractères héréditaires. Des parents et leur descendance peuvent être très bien corrélés pour une caractéristique comme la taille, mais à cause d'une différence de milieu d'une génération à l'autre, chacun des enfants peut être plus grand que les parents. Ce phénomène apparaît dans des études sur l'adoption, où les enfants, quoique corrélés à leurs parents biologiques, peuvent en moyenne en être très différents en raison d'un changement de leur situation sociale.

Covariance et Variance d'une somme. Dans le tableau 27-1, les variances des pattes gauches et droites sont de 0.8275 et de 1.1475, qui s'additionnent pour donner 1,975, mais la variance de la somme des deux types de pattes T est seulement d'1,71, ce qui signifie que la variance du tout est moindre que la somme des variances des parties. Cet écart est dû à la corrélation négative existant entre les côtés gauches et droits. Les côtés gauches les plus grands sont associés aux côtés droits plus petits et vice versa, de sorte que la somme des deux côtés varie moins que chaque côté séparément. Si, par ailleurs, une corrélation positive existait entre côtés, les côtés les plus larges tant gauches que droites iraient ensemble et la variation de la somme des deux côtés serait plus grande que la somme des deux variances séparées. En général, si $x + y = T$ alors

$$s_T^2 = s_x^2 + s_y^2 + 2 \text{ cov } xy$$

ce qui donne pour le tableau 27-1

$$s_T^2 = 1{,}71 = 0{,}8275 + 1{,}1475 - 2(0{,}1325)$$

Régression

La mesure de la corrélation ne nous fournit qu'une estimation de la précision de la relation existant entre deux variables. Un problème connexe consiste à prédire la valeur d'une variable d'après la valeur prise par l'autre. Si x augmente de deux unités, de combien y augmentera-t-elle ? Si les deux variables sont liées linéairement, l'expression de la relation peut s'écrire

$$y = bx + a$$

où b est la pente de la droite reliant y à x et a est le point d'intersection de cette droite avec y.

La figure 27-8 présente un diagramme de dispersion pour deux variables, y et x, en même temps qu'une droite reflétant l'accroissement linéaire de y en fonction de l'augmentation de x. Cette droite, dénommé **droite de régression de y sur x**, a été tracée de telle sorte que les écarts des points à la droite soient aussi petits que possibles. De manière spécifique, si D y est la distance de n'importe quel point de la droite en direction de y, alors la droite a été choisie de telle sorte que

$$\Sigma\,(\Delta y)^2 = \text{un minimum}$$

Toute autre ligne droite passant au travers des points du diagramme de dispersion présentera une somme plus élevée des carrés des écarts par rapport aux points de la droite.

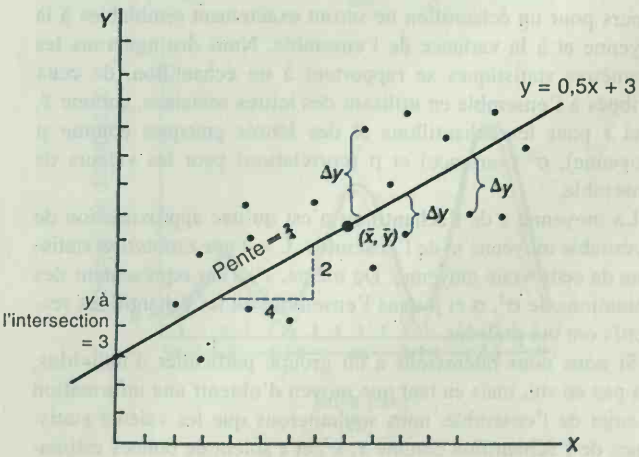


Figure 27-8. Diagramme de dispersions établissant la relation entre deux variables, x et y, et la droite de régression de y sur x. Cette droite, de pente 2/4, minimise les carrés des écarts (Δy).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Il est clair que **la droite des moindres carrés** ne peut être trouvée par approximations successives. Il se trouve cependant que si la pente b de la droite est calculée comme

$$b = \frac{\text{cov } xy}{s_x^2}$$

et a comme

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

de telle façon que la droite passe par les points $\bar{x},\bar{y}$, alors ces valeurs de b et de a fourniront l'équation de prévision des moindres carrés.

Notez que l'équation ne peut prévoir exactement y pour une valeur donnée de x, du fait de la dispersion existant autour de la droite. L'équation prédit l'y **moyen** pour un x donné, pour autant que de grands échantillons soient considérés.

Echantillons et Populations

Les sections précédentes ont décrit les distributions et quelques éléments de statistique appliqués à des groupes d'individus réunis au cours d'expériences ou de séries d'observations. Cependant nous ne sommes pas réellement intéressés par les quelque 100 étudiants ou 27 serpents utilisés pour obtenir des mesures. Au contraire, nous sommes intéressés par des phénomènes de portée plus générale dont les individus de l'expérience peuvent être considérés comme représentatifs. En fait, nous voudrions connaître la taille moyenne *en général* des étudiants ou le poids moyen *en général* des graines de l'espèce végétale *Crinum longifolium*. Nous sommes donc intéressés par des caractéristiques **d'un ensemble**, dont notre petite collection d'observations ne représente qu'**un échantillon.** Les caractéristiques de chaque échantillon ne sont, bien entendu, pas identiques à celles de l'ensemble global mais varient d'échantillon à échantillon. Deux échantillons d'étudiants extraits de l'ensemble de tous les étudiants n'auront pas exactement la même moyenne ($\bar{x}$) ou variance (s^2) pas plus que ces valeurs pour un échantillon ne seront exactement semblables à la moyenne et à la variance de l'ensemble. Nous distinguerons les paramètres statistiques se rapportant à un échantillon, de ceux attribués à l'ensemble en utilisant des lettres romaines, comme $\bar{x}$, s^2 et r pour les échantillons et des lettres grecques comme μ (moyenne), σ^2 (variance) et ρ (corrélation) pour les valeurs de l'ensemble.

La moyenne $\bar{x}$ de l'échantillon n'est qu'une approximation de la véritable moyenne m de l'ensemble. C'est une *estimation* statistique de cette vraie moyenne. De même, s^2, s et r représentent des estimations de σ^2, σ et ρ dans l'ensemble où les échantillons respectifs ont été prélevés.

Si nous nous intéressons à un groupe particulier d'individus, non pas en soi, mais en tant que moyen d'obtenir une information au sujet de l'ensemble, nous souhaiterons que les valeurs statistiques de l'échantillon comme $\bar{x}$, s^2, et r soient de bonnes estimations des vraies valeurs σ^2, σ et ρ Il y a de nombreux critères permettant de définir une «bonne» estimation, mais l'un des plus adéquats requiert que la valeur moyenne de l'estimation établie sur un grand nombre d'échantillons représente effectivement la valeur vraie de l'ensemble; autrement dit l'estimation ne doit pas être **biaisée**, de sorte que $\bar{x}$ est en fait une estimation non-biaisée de μ. Si un grand nombre d'échantillons sont utilisés et $\bar{x}$ calculée pour chacun d'eux, dans ce cas la moyenne des valeurs de $\bar{x}$ sera μ. Malheureusement, s^2, comme nous l'avons défini, n'est pas une estimation non-biaisée de σ^2. Le calcul de σ^2 se base sur les écarts de chaque observation par rapport à la moyenne $\bar{x}$ de l'*échantillon*, et non par rapport à la vraie moyenne μ. Mais la moyenne de l'échantillon se calcule à partir des valeurs observées dans l'échantillon, de telle sorte que les écarts entre observations et la moyenne de l'échantillon ne peuvent varier autant qu'ils le font vis-à-vis de la vraie moyenne. Il en résulte que s2 a tendance à être un peu plus petit et la moyenne des valeurs de s^2 est inférieure à σ^2. L'importance de la déviation est associée à la taille N de chaque échantillon et on peut montrer que $[N/(N-1)]s^2$ est une estimation non-biaisée de σ^2. Donc chaque fois que nous nous intéressons à la variance d'une série de mesures - pas en tant que caractéristique d'un échantillon donné mais comme estimation de l'ensemble représenté par les échantillons - la valeur appropriée à utiliser est $[N/(N-1)]s^2$ plutôt que s^2 lui-même. Remarquez que cette nouvelle valeur équivaut à diviser la somme des carrés des écarts par N-1 au lieu de N, de telle sorte que

$$\left(\frac{N}{N-1}\right)s^2 = \left(\frac{N}{N-1}\right)\left(\frac{1}{N}\right)\Sigma\,(x_i - \bar{x})^2$$

$$= \frac{1}{N-1}\,\Sigma\,(x_i - \bar{x})^2$$

Toutes ces considérations sur les déviations s'appliquent aussi à la covariance de l'échantillon. Par contre, dans la formule du coefficient de corrélation (page 824), le facteur N/(N-1) apparaîtra tant au numérateur qu'au dénominateur et donc ne jouera aucun rôle dans l'établissement du calcul.

Génotypes et distribution des phénotypes

En nous basant sur les concepts de distribution, moyenne et variance, nous pouvons expliquer la différence entre caractères quantitatifs et mendéliens. Supposons qu'une population de plantes contienne trois génotypes, chacun d'eux ayant un effet différent sur le taux de croissance. En outre, supposons qu'une variation due au milieu existe de plante à plante en raison des propriétés non-homogènes du sol sur lequel la population se développe et qu'il se produise des fluctuations fortuites au cours du développement (voir page 15). Pour chaque génotype, nous aurons une distribution de phénotypes distincte avec une moyenne et un écart type qui dépend du génotype et des facteurs de l'environnement. Supposons que ces distributions se présentent comme les trois distributions de hauteurs de la figure 27-9a. Finalement, admettons que la population comprenne un mélange des trois génotypes mais dans la proportion 1 : 2 : 3. Dès lors, la distribution phénotypique des individus de la population globale sera du type représenté par la ligne noire de la figure 27-9b, résultant de la somme des trois distributions génotypiques qui la sous-tendent, pondérées par leur

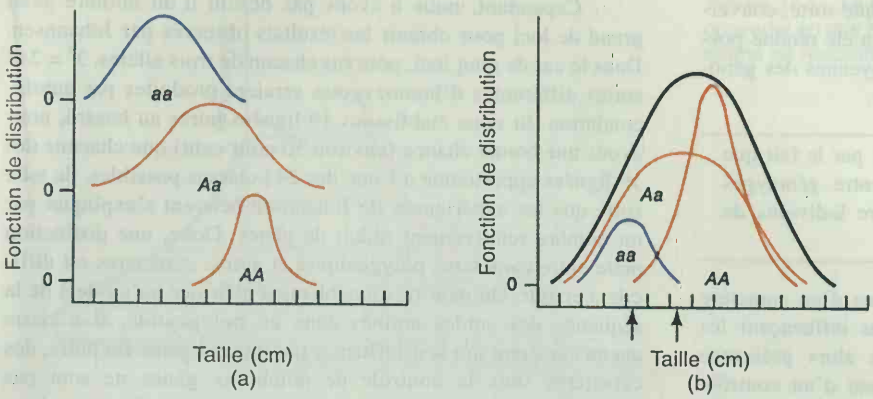


Figure 27-9. (a) Distributions phénotypiques de trois génotypes. (b) Distribution phénotypique d'une population résultant du mélange d'individus de trois génotypes dans la proportion 1:2:3 (*aa* : *Aa* : *AA*).

fréquence dans la population. La moyenne de cette distribution globale est la moyenne des trois moyennes génotypiques, cette fois aussi pondérée par la fréquence des génotypes dans la population. La variance de la distribution globale est produite en partie par la variation due à l'environnement et en partie par les moyennes légèrement différentes des trois génotypes.

Deux propriétés de la distribution globale sont à relever. Tout d'abord, il n'y a qu'un seul mode. Malgré l'existence de trois distributions génotypiques distinctes, la distribution de la population dans son ensemble ne met pas en évidence des modes distincts. Deuxièmement, n'importe quel individu dont la hauteur se situe entre les deux flèches pourrait provenir de n'importe lequel des trois génotypes en raison de leur chevauchement. Il en résulte que nous ne pouvons pas mener une analyse mendélienne simple pour déterminer le génotype d'un individu. Par exemple, supposons que les trois génotypes soient représentés par les deux homozygotes et l'hétérozygote pour une paire d'allèles à un locus donné. Disons que *aa* représente l'homozygote de petite taille et *AA* celui de grande taille, l'hétérozygote étant de taille intermédiaire. En raison du chevauchement entre les distributions de phénotypes, nous ne pouvons pas savoir quel génotype correspond à un individu donné. Réciproquement, si nous croisons deux individus qui sont respectivement un homozygote *aa* et un hétérozygote *Aa*, la descendance ne comportera pas deux classes distinctes dans un rapport 1 : 1 mais englobera presque la gamme entière des phénotypes. Donc, nous ne pouvons pas savoir que le croisement est $aa \times Aa$ et non $aa \times AA$ ou $Aa \times Aa$.

Supposons que nous cultivons les plantes hypothétiques de la figure 27-9 dans un milieu qui accentue les différences entre génotypes, par exemple, en doublant le taux de croissance de tous les génotypes. Au même moment, nous sommes très attentifs à ce que toutes les plantes se développent dans exactement le même milieu. Dans ce cas, la variance phénotypique de chaque génotype distinct se réduit parceque toutes les plantes croissent dans des conditions identiques; en même temps les différences entre génotypes peuvent s'accentuer par la rapiditié de la croissance. Le résultat (figure 27-10) sera la séparation de l'ensemble de la population en trois distributions de phénotypes ne se chevauchant pas, chacune caractéristique d'un génotype. Une analyse mendélienne tout à fait conventionnelle du caractère taille de la plante pourra dès lors être

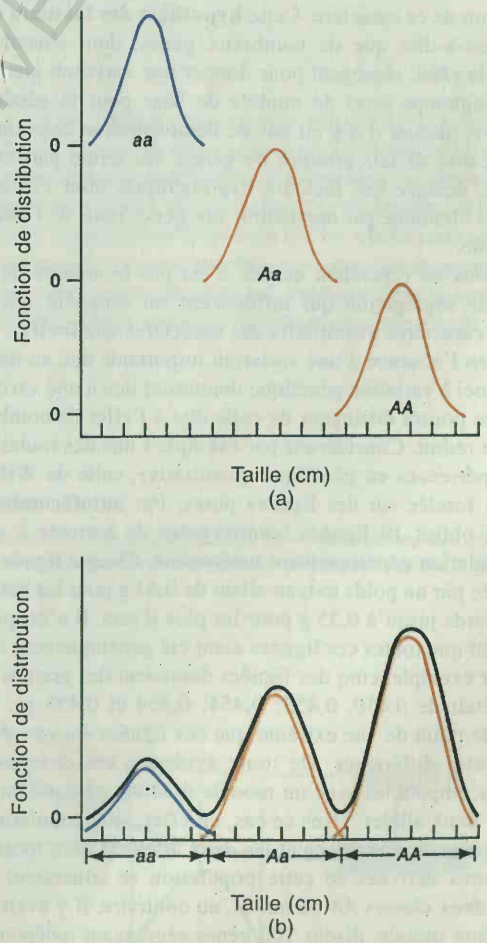


Figure 27-10. Si les mêmes génotypes que ceux de la figure 27-9 se développent dans des conditions de stress contrôlées, il en résulte une variation phénotypique plus faible pour chaque génotype et une différence accrue entre génotypes.

SOUTH SASKATCHEWAN UNIVERSITY LIBRARY

menée. Un caractère «quantitatif» a été, en quelque sorte, converti en un caractère»qualitatif». Cette conversion a été rendue possible en accentuant les différences entre les moyennes des génotypes par rapport à la variation intragénotypique.

Message Un caractère **quantitatif** se définit par le fait que les différences phénotypiques moyennes entre génotypes sont faibles par rapport à la variation entre individus de même génotype.

On postule parfois que la variation continue d'un caractère reflète le grand nombre de gènes ségrégeants influençant les valeurs mesurées; la variation continue est alors présentée comme un commencement de preuve en faveur d'un contrôle multigénique. En fait, comme nous venons de le voir, cela n'est pas nécessairement vrai. Si la différence entre moyennes génotypiques est faible comparée à la variance due au milieu, des cas aussi simples qu'un gène - deux allèles conduisent à une variation continue.

Il va de soi que si l'amplitude du caractère est limitée et si de nombreux loci en ségrégation l'influencent nous nous attendons à ce qu'il se caractérise par une variation continue, puisque chaque substitution allélique ne doit entraîner qu'une petite modification de ce caractère. Cette **hypothèse des facteurs multiples** (c'est-à-dire que de nombreux gènes, dont chacun n'a qu'un faible effet, ségrègent pour donner une variation quantitative), a longtemps servi de modèle de base pour la génétique quantitative, quoiqu'il n'y ait pas de démonstration convaincante de la réalité de tels groupes de gènes. Un terme particulier, **polygènes**, désigne ces facteurs hypothétiques dont l'effet est faible mais identique par opposition aux gènes issus de l'analyse mendélienne.

Rappelons ici cependant que ce n'est pas *le nombre* de loci capables de ségrégation qui influencent un caractère qui distingue les caractères quantitatifs des caractères qualitatifs.

Même en l'absence d'une variation importante due au milieu, quelques loci à variation génétique donneront lieu à une variation que l'on ne pourra distinguer de celle due à l'effet de nombreux loci à effet réduit. Considérons par exemple l'une des toutes premières expériences en génétique quantitative, celle de Wilhelm Johannsen fondée sur des lignées pures. Par **autofécondation**, Johannsen obtint 19 lignées homozygotes de haricots à partir d'une population génétiquement hétérogène. Chaque lignée était caractérisée par un poids moyen allant de 0,64 g pour les haricots les plus lourds jusqu'à 0,35 g pour les plus légers. Il n'est pas du tout évident que toutes ces lignées aient été génétiquement différentes (par exemple, cinq des lignées donnaient des graines dont le poids était de 0.450, 0,453; 0,454; 0,454 et 0,455 g), mais adoptons le point de vue extrême que ces lignées *étaient effectivement* toutes différentes. De toute évidence, ces observations seraient incompatibles avec un modèle d'action génique du type un locus - deux allèles. Dans ce cas, en effet, si la population de départ ségrégeait effectivement les deux allèles *A* et *a*, toutes les lignées pures dérivées de cette population se situeraient dans l'une des deux classes *AA* ou *aa*. Si, au contraire, il y avait dans la population initiale, disons 100 gènes ségrégeant indépendamment et n'exerçant chacun qu'un effet léger, un grand nombre de lignées pures différentes pourraient être produites, chacune présentant une combinaison particulière d'homozygotes pour les différents loci.

Cependant, nous n'avons pas besoin d'un nombre aussi grand de loci pour obtenir les résultats observés par Johannsen. Dans le cas de cinq loci, pourvus chacun de trois allèles, $3^5 = 243$ sortes différentes d'homozygotes seraient produites par autofécondation. Si nous établissons 19 lignées pures au hasard, nous avons une bonne chance (environ 50 pour cent) que chacune des 19 lignées appartienne à l'une des 243 classes possibles, de telle sorte que les expériences de Johannsen peuvent s'expliquer par un nombre relativement réduit de gènes. Donc, une distinction nette entre caractères polygéniques et autres caractères est difficile à établir. On peut raisonnablement affirmer qu'au-delà de la séquence des acides aminés dans un polypeptide, il n'existe aucun caractère qui soit influencé par un seul gène. En outre, des caractères sous le contrôle de nombreux gènes ne sont pas influencés de la même manière par chacun d'eux. Certains gènes auront des effets majeurs et d'autres mineurs sur un caractère donné.

Message La différence cruciale existant entre des caractères mendéliens et quantitatifs ne réside pas dans le nombre de loci qui ségrègent mais bien dans l'ampleur des différences phénotypiques entre génotypes comparée à la variation individuelle au sein des classes génotypiques.

Norme de réaction et distribution phénotypique

Nous avons vu que la distribution phénotypique d'un caractère est fonction de la moyenne des différences entre génotypes et de la variation entre individus génotypiquement identiques. Ces deux facteurs sont, à leur tour, fonction des milieux dans lesquels les organismes déroulent leur cycle de vie. Pour un génotype donné, chaque milieu conduira à un phénotype donné (pour le moment, nous ne prenons pas en compte les événements fortuits au cours du développement). Il en résultera qu'**une distribution de milieux** se reflètera biologiquement comme **une distribution de phénotypes**. La façon dont la distribution des milieux se transforme en une distribution phénotypique est déterminée par **la norme de réaction**, comme décrit à la figure 27-11. L'abscisse représente le milieu (disons, la température) et l'ordonnée le phénotype (disons, la taille des plantes). La courbe traduisant la norme de réaction pour le génotype montre comment à chaque temperature correspond une taille déterminée de la plante. Ainsi, les pointillés tirés à partir du point 18°C sur l'axe des températures mènent via la courbe de norme de réaction à une hauteur de plante correspondante sur l'axe vertical des phénotypes, et ceci de même pour chaque température. Si un grand nombre d'individus se développent, disons à 20°C, un grand nombre d'individus présentent les caractères correspondant à 20°C comme montré par la ligne en pointillé, et si seulement un petit nombre d'individus se développent à 18°C, peu de plantes seront de taille correspondante. Dès lors, la distribution des fréquences des milieux lors du développement se reflètera dans la distribution des fréquences comme déterminé par la forme de la courbe de norme de réaction. Tout se passe comme si un observateur, situé sur l'axe vertical des phénotypes voyait la distribution des milieux; non pas directement, mais réfléchie dans le miroir incurvé de la norme de réaction. La forme de la courbe détermine dans laquelle mesure la distribution des milieux est

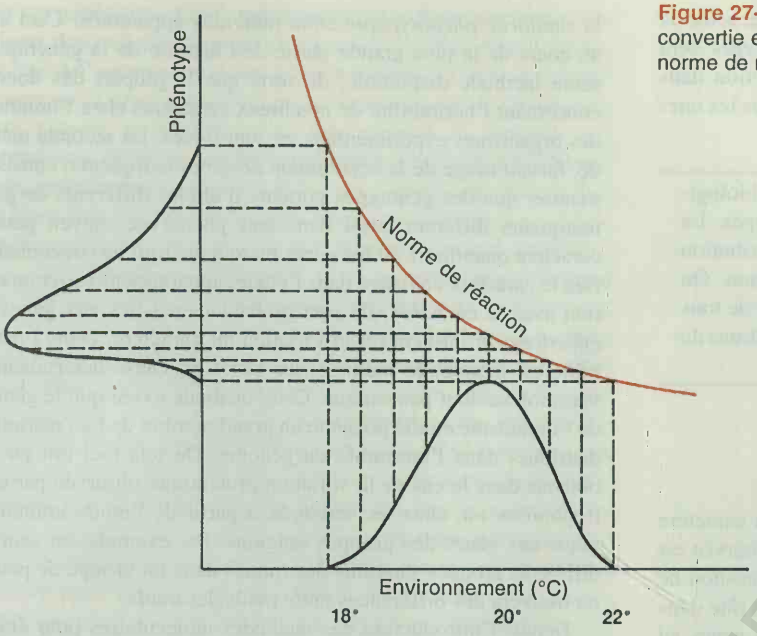


Figure 27-11. La distribution des milieux sur l'axe horizontal est convertie en une distribution de phénotypes sur l'axe vertical par la norme de réaction d'un génotype.

déformée sur l'axe des phénotypes. A la figure 27-1, la norme de réaction décroît rapidement aux basses températures (le phénotype se modifie rapidement pour de faibles changements de température), mais s'étale aux températures plus élevées. Il en résulte que la distribution symétrique des milieux se traduit par une distribution asymétrique des phénotypes, caractérisée par un étalement pour les tailles les plus élevées des plantes, correspondant aux plus basses températures.

La même analyse nous montre (figure 27-12) comment une population formée de deux génotypes à normes de réaction différentes possède une distribution phénotypique qui dépend de la distribution des milieux. Si les milieux se répartissent selon la courbe noire, la population de plantes qui en résulte aura une distribution unimodale, puisque la différence entre génotypes est très petite dans cette gamme de milieux comparée avec la sensibilité des normes de réaction vis-à-vis de faibles changements de températu-

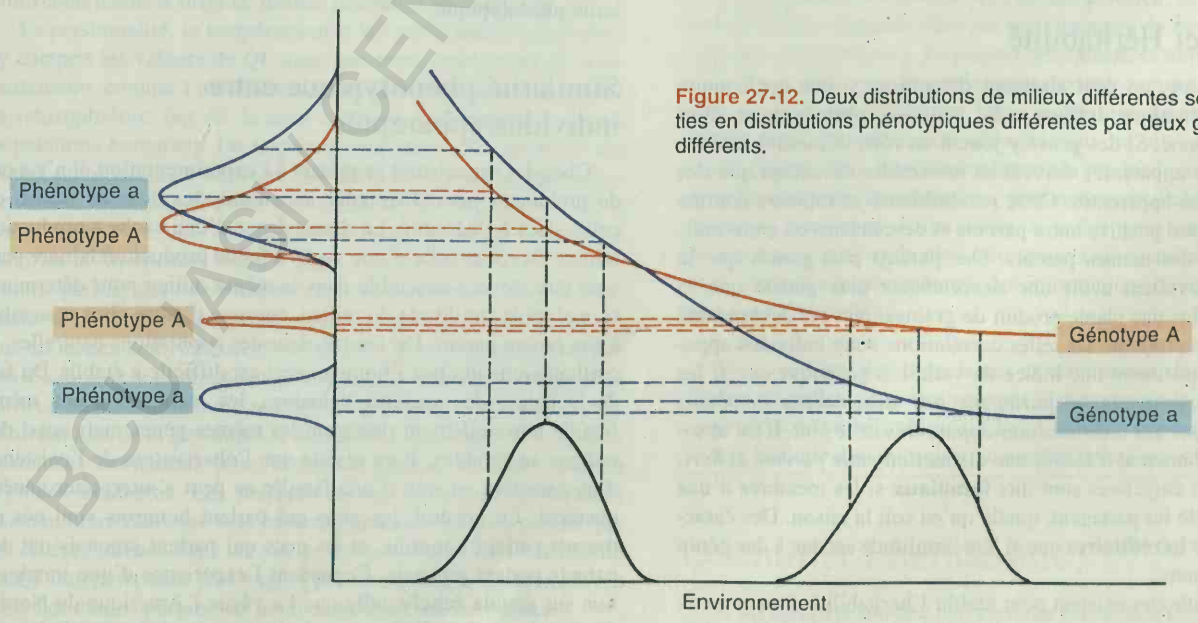


Figure 27-12. Deux distributions de milieux différentes sont converties en distributions phénotypiques différentes par deux génotypes différents.

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

re. Si la distribution des milieux se décale vers la droite, selon la courbe colorée, une distribution bimodale des phénotypes sera observée, en raison de l'étalement des normes de réaction dans cette gamme de milieux où elles sont aussi très différentes les unes des autres.

Message La distribution des milieux se répercute biologiquement sous forme d'une distribution de phénotypes. La conversion d'une distribution de milieux en une distribution phénotypique est déterminée par la norme de réaction. On appelle norme de réaction d'un génotype l'ensemble de tous les phénotypes auxquels il mène dans toutes les conditions de milieu existantes.

L'héritabilité d'un caractère

La question fondamentale à se poser au sujet d'un caractère quantitatif consiste à savoir si oui ou non la variation observée est influencée par des gènes. Remarquons bien que cette question ne revient pas à se demander si des gènes jouent ou non un rôle dans le développement du caractère considéré. L'action des gènes au cours du développement détermine l'expression de chaque caractère, mais la *variation* d'individu à individu n'est pas nécessairement le résultat d'une *variation génétique*.La possibilité de parler n'importe quelle langue dépend essentiellement des structures du système nerveux central de même que des cordes vocales, de la langue, de la bouche et des oreilles, qui à leur tour dépendent de la nature du génome humain. Aucun milieu ne suscitera la parole chez des vaches, mais quoique les langues parlées par l'homme varient de nation à nation, cette variation est entièrement non-génétique.

Message La question de savoir si un caractère est oui ou non héréditaire pose celle du rôle joué par les différences géniques dans les différences phénotypiques existant entre individus ou groupes d'individus.

Parenté et Héritabilité

En principe, on peut aisément déterminer si une quelconque variation génétique influence la variation phénotypique d'un caractère donné. Si des gènes y jouent un rôle, des individus biologiquement apparentés doivent se ressembler davantage que des individus non-apparentés. Cette ressemblance se reflètera comme une corrélation positive entre parents et descendants ou entre individus issus des mêmes parents. Des parents plus grands que la moyenne devraient avoir une descendance plus grande que la moyenne; plus une plante produit de graines, plus ses descendants devraient en produire. De telles corrélations entre individus apparentés ne constituent une indice de variation génétique *que si les individus apparentés ne partagent pas des milieux communs davantage que des individus non-apparentés ne le font.* Il est absolument fondamental d'établir une distinction entre *parenté* et *héritabilité*. Des caractères sont dits **familiaux** si les membres d'une même famille les partagent, quelle qu'en soit la raison. Des caractères ne sont **héréditaires** que si leur similitude est due à des génotypes communs.

Deux méthodes existent pour établir l'héritabilité d'un caractère séparément de son occurence familiale. La première dépend de la *similarité phénotypique* entre individus apparentés. Ceci a été au cours de la plus grande partie de l'histoire de la génétique la seule méthode disponible, de sorte que la plupart des données concernant l'héritabilité de nombreux caractères chez l'homme et des organismes expérimentaux en sont issues. La seconde méthode, faisant usage de la *ségrégation de gènes marqueurs*, consiste à montrer que des génotypes porteurs d'allèles différents de gènes marqueurs différent aussi dans leur phénotype moyen pour le caractère quantitatif. Si les gènes marqueurs (qui ne concernent en rien le caractère envisagé dans l'étude) apparaissent varier en relation avec le caractère, ils sont probablemenet liés aux gènes qui *effectivement* influencent la variation du caractère. Donc l'héritabilité est démontrée même si les gènes en cause déterminant la variation ne sont pas connus. Cette méthode exige que le génome de l'organisme étudié présente un grand nombre de loci marqueurs distribués dans l'ensemble du génome. De tels loci ont pu être obtenus dans le cas de la variation protéinique observée par electrophorèse, ou, chez les vertébrés, à partir de l'étude immunologique des gènes des groupes sanguins. Par exemple, au sein des différents groupes sanguins déterminés dans un groupe de poulets on trouvera des différences entre poids des oeufs.

Depuis l'introduction des méthodes moléculaires pour étudier les variations de séquence de l'ADN, un grand nombre de variation dans la position des nucléotides a été découvert chez un nombre élévé d'organismes. Cette variation moléculaire inclut à la fois des remplacements de simples nucléotides et des insertions et délétions de séquences de nucléotides plus longues. Ces variations se détectent généralement par le gain ou la perte des sites de clivage d'enzymes de restriction ou par la variation de longueurs de séquence d'ADN entre deux sites établis de restriction. Tous deux représentent une forme de polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLPs). Chez la tomate, des variétés porteuses de différents types de RFLP diffèrent dans les caractéristiques de leurs fruits.

Cependant, comme ce qui est connu ou proclamé connu en matière d'héritabilité dépend encore de la similarité phénotypique entre individus apparentés, spécialement en génétique humaine, nous aborderons le problème de l'héritabilité en analysant la similarité phénotypique.

Similarité phénotypique entre individus apparentés

Chez des organismes se prêtant à l'expérimentation, il n'y a pas de problèmes pour distinguer les similitudes dues au milieu de celles dues à l'hérédité. La descendance d'une vache à production laitière élevée et celle d'une vache à faible production laitière peuvent être élevées ensemble dans le même milieu pour déterminer si, malgré la similitude du milieu, chacune d'entre elles ressemble à son propre parent. Par contre, dans des populations naturelles, et particulièrement chez l'homme, ceci est difficile à établir. Du fait de la nature des sociétés humaines, les membres d'une même famille non seulement partagent les mêmes gènes mais aussi des milieux semblables. Il en résulte que l'observation de l'existence d'un caractère au sein d'une famille ne peut s'interpréter génétiquement. En général, les gens qui parlent hongrois sont nés de parents parlant hongrois, et les gens qui parlent japonais ont des parents parlant japonais. Cependant l'expérience d'une immigration sur grande échelle telle que l'a vécue l'Amérique du Nord a démontré que les différences de langue, quoique familiales, ne

sont pas génétiques. Les corrélations les plus élevées entre parents et leurs descendants du point de vue des caractères sociologiques ont trait à l'appartenance aux partis politiques et aux sectes religieuses, mais ces caractéristiques ne s'héritent pas. La distinction entre parenté et hérédité n'est pas toujours si évidente. La Commission de Santé Publique qui étudia originellement la pellagre, maladie causée par une déficience vitaminique dans le Sud des Etats-Unis en 1910 arriva à la conclusion que son origine était génétique parce qu'elle touchait des familles dans leur ensemble!

La détermination de l'hérédité d'un caractère chez l'homme doit se baser sur des cas d'adoption pour éviter la similitude de milieu fréquemment rencontré chez les individus biologiquement apparentés. Les sujets d'expérience idéaux sont des jumeaux identiques élevés indépendamment l'un de l'autre, puisqu'ils sont génétiquement identiques et qu'ils évoluent dans des milieux différents. De telles études d'adoption doivent aussi se préoccuper de ce qu'aucune corrélation n'existe entre le milieu social de la famille adoptive et celui de la famille biologique. Des exigences de ce type ne sont que très rarement satisfaites, de sorte qu'en pratique notre connaissance sur la nature héréditaire des caractères quantitatifs de type familial est très réduite. La couleur de la peau - comme le poids à l'âge adulte - est clairement héréditaire, mais même dans ces cas nous devons être très prudents. Nous savons que la couleur de la peau est contrôlée par plusieurs gènes grâce à des études d'adoptions entre races et d'observations montrant que les descendants d'esclaves africains noirs étaient noirs même s'ils étaient nés et élevés au Canada. Mais les différences de taille entre Japonais et Européens sont-elles dues à des gènes ? Les enfants d'immigrants japonais, nés et élevés en Amérique du Nord sont de taille plus élevée que leurs parents mais cependant plus petits que la moyenne des Nord-Américains, ce qui nous permettrait de conclure que des différences génétiques jouent ici leur rôle. Cependant, les Nippo-Américains de deuxième génération sont encore plus grands que leurs parents nés en Amérique! L'influence culturelle ainsi que celle due au milieu, ou peut-être un effet maternel, sont donc encore ressenties dans la première génération née en Amérique du Nord. Nous ne sommes pas à même de dire si des différences génétiques en rapport avec la taille distinguent les Nord-américains d'origine, disons, japonaise ou suédoise.

La personnalité, le tempérament et les performances cognitives (y compris les valeurs du QI) ainsi que toute une gamme de comportements comme l'alcoolisme et de désordres mentaux comme la schizophrénie, ont été le sujet d'études d'héritabilité chez des populations humaines. De nombreuses d'entre elles décèlent une composante familiale dans ces caractères.En effet, une corrélation positive a été montrée entre les valeurs de QI chez les parents et celles de leurs enfants (la corrélation étant d'environ 0.5 dans les familles d'Américains blancs), mais l'existence de cette correlation ne permet pas de distinguer entre composante familiale d'héritabilité. Il faut encore que la correlation entre parents et enfants due au milieu soit rompue, de sorte que les études portant sur des cas d'adoption sont répandues. Du fait de la dificulté de répartir les milieux au hasard, même dans des cas d'adoption, les cas évidents d'héritabilité de la personnalité humaine et des caractères du comportement demeurent sujet à caution malgré le grand nombre d'études existantes. Les préjugés sur les causes des différences existant entre hommes sont monnaie courante et il en résulte que les critères utilisés dans les études tendant à prouver l'héritabilité du QI sont nettement plus vagues par exemple que ceux employés dans des études portant sur le rendement en lait de vaches.

La figure 27-13 résume la méthode classiquement utilisée pour prouver l'héritabilité d'un caractère chez des organismes expérimentaux. Des individus appartenant aux deux extrêmes de la distribution sont croisés avec leurs semblables et les descendances de ces croisements sont élevées dans le même milieu. Si en moyenne une différence apparaît entre les deux groupes de descendants, le caractère est héréditaire. La plupart des caractères morphologiques chez *Drosophila*, par exemple, apparaissent comme héréditaires, mais ce n'est pas le cas pour tous. Si des mouches dont les ailes droites sont légèrement plus allongées que les ailes gauches sont croisées entre elles, leur descendance n'a pas tendance à présenter un type «ailes droites allongées» plus nettement établi que la descendance provenant de mouches à «ailes gauches allongées». Comme nous le verrons plus loin (page xxx), cette méthode peut aussi être utilisée pour obtenir des informations de nature quantitative sur l'héritabilité.

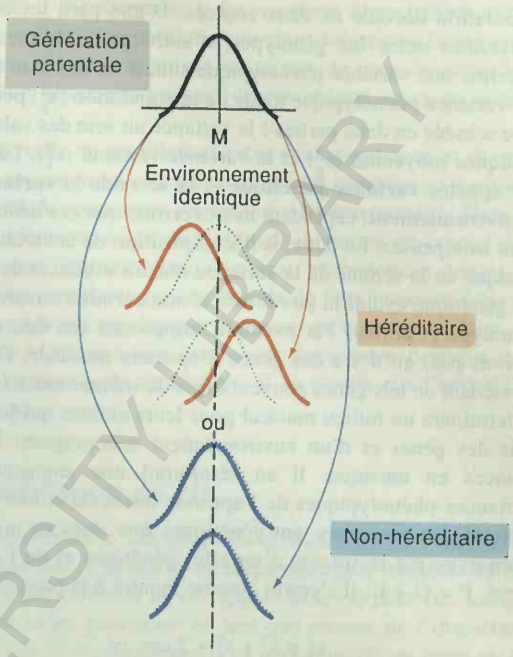


Figure 27-13. Méthode type pour estimer l'héritabilité chez des organismes expérimentaux. Des croisements sont menés entre deux populations d'individus sélectionnés parmi les extrêmes de la distribution phénotypique dans la génération parentale. Si les distributions phénotypiques des deux groupes de descendants sont significativement différentes l'une de l'autre, le caractère est dès lors héréditaire. Si les distributions phénotypiques ressemblent toutes deux à la distribution de la génération parentale, le caractère n'est pas héréditaire.

Message Chez des organismes expérimentaux, la similitude due au milieu peut être souvent distinguée de la similitude génétique (ou héritabilité). Chez l'homme, cependant, il est très difficile d'établir qu'un caractère donné est héréditaire.

Quantifier l'héritabilité

Si un caractère montre une certaine héritabilité dans une population, il est alors possible de quantifier son degré d'héritabilité. La figure 27-9 montre que la variation au sein des phénotypes d'une

PUBLIC DOMAIN UNIVERSITY LIBRARY

population découle de deux sources. D'une part, les différences moyennes entre les génotypes; d'autre part, chaque génotype exprime une variance phénotypique suite à la variation du milieu. La variance phénotypique totale de la population (s_p^2) peut dès lors être scindée en deux parties : la variance au sein des valeurs génotypiques moyennes (s_g^2) et la variance restante (s_e^2). La première est appelée **variance génétique** et la seconde la **variance due à l'environnement**; cependant nous verrons que ces dénominations sont trompeuses. En outre, la décomposition de la variance phénotypique en la somme de la variance due au milieu et de la variance génétique exclut la possibilité d'une certaine covariance entre génotype et milieu. Par exemple, supposons (en fait, nous ne le savons pas) qu'il y a des gènes d'aptitude musicale. Des parents possédant de tels gènes peuvent être eux-mêmes musiciens, ce qui déterminera un milieu musical pour leurs enfants qui jouiront à la fois des gènes et d'un environnement encourageant les performances en musique. Il en résulterait une augmentation des variances phénotypiques de l'aptitude musicale et une estimation erronée des variances tant génétiques que dues au milieu. Si le phénotype est la somme d'un effet génétique et de l'environnement, P = G + E, il s'ensuit comme montré à la page xxx que

$$s_p^2 = s_g^2 + s_e^2 + 2 \text{ cov } ge.$$

Si les génotypes ne se répartissent pas au hasard au sein des milieux représentés, une certaine covariance génotype-milieu s'établira et la covariance sera marqué au sein des variances génétique et du milieu. Par exemple, supposez qu'il soit vrai (nous ne savons pas en fait) que des gènes influencent le don musical. Les parents présentant ces gènes peuvent être eux-mêmes musiciens, ce qui entraînera pour leurs enfants un contexte nettement plus musical qui jouiront à la fois de leurs gènes et d'un milieu favorables aux performances musicales. Il en résulterait une augmentation des variances phénotypiques pour le don musical et une estimation erronnée des variances génétiques et dues au milieu.

Le degré d'héritabilité peut dès lors être défini comme la contribution de la variance génétique à la variance totale :

$$H^2 = \frac{s_g^2}{s_p^2} = \frac{s_g^2}{s_g^2 + s_e^2}$$

Ainsi défini, H^2 peut s'appeler l'**héritabilité au sens large** du caractère.

Nous devons souligner que cette mesure de «l'influence génétique» nous indique quelle proportion de la variation des phénotypes peut être assignée à la variation des génotypes. Elle ne nous dit cependant pas quelle proportion du phénotype d'un *individu* peut être attribuée respectivement à l'hérédité et à l'environnement. Cette dernière distinction n'est pas très raisonnable. En effet, le phénotype d'un individu est la conséquence de l'interaction de ses gènes avec son milieu. Il serait stupide de déclarer que vous devez 150 cm de votre taille à vos gènes et 25 cm à votre environnement. Toutes les estimations de «l'importance» des gènes sont établies en fonction de la proportion de la variance imputable à leur variation. Cette approche représente une application spécifique de la technique plus générale de l'**analyse de la variance** qui permet d'apprécier le poids relatif de la contribution de diverses causes. La méthode fut, en fait, inventée tout d'abord pour traiter le cas d'expériences dans lesquelles différents facteurs génétiques et de l'environnement influençaient la croissance de plantes. (Pour une analyse approfondie mais accessible de l'analyse de la variance écrite pour des biologistes, se rapporter à R. Sokal et J. Rohlf, *Biometry*, 2ième éd., W.H. Freeman and Company, 1980.).

Méthodes d'estimation de H^2

La variance génétique et l'héritabilité peuvent être estimées de plusieurs façons. La plus directe consiste à estimer s_e^2 en établissant une série de lignées homozygotes à partir de la population, de les croiser deux à deux pour obtenir des individus hétérozygotes et de mesurer la variance phénotypique *au sein de* chaque génotype hétérozygote. Puisqu'il n'y a pas de variance génétique à l'intérieur d'une classe de génotypes, ces variances fourniront (en moyenne) une estimation de s_e^2. Cette valeur peut alors être soustraite de celle de s_p^2 dans la population originale pour donner s_g^2. Par cette méthode, toute covariance existant entre génotype et milieu dans la population de départ sera cachée dans l'estimation de la variance génétique et la gonflera.

D'autres façons d'estimer la variance génétique font usage des similitudes génétiques entre individus apparentés. Sur la base de simples principes mendéliens, nous pouvons voir qu'une moitié des gènes chez des enfants de mêmes parents seront (en moyenne) identiques. Afin de les distinguer, nous pouvons désigner de manière différente les allèles d'un locus présents chez les parents; disons A_1A_2 et A_3A_4. La probabilité que l'aîné des enfants reçoive A_1 de son père est de 1/2, de même que pour le cadet, de telle sorte que les deux enfants ont 1/2 × 1/2= 1/4 de chance de porter tous deux A_1. D'autre part, ils pourraient tous deux avoir reçu un A_2 de leur père et donc ils ont aussi une probabilité d'1/4 de porter un gène en commun hérité de leur père. Dès lors, la chance que les deux enfants portent A_1 ou A_2 est de 1/4 + 1/4 = 1/2. Dans l'autre moitié des cas, un des enfants héritera de A_1, alors que l'autre héritera de A_2. Ainsi, en ce qui concerne les gènes hérités paternellement, les enfants de mêmes parents ont 50 pour cent de chance de porter le même allèle. Le même raisonnement peut s'appliquer aux gènes hérités maternellement. En établissant la moyenne pour les gènes hérités maternellement et paternellement, on conclura que la moitié des gènes de ces enfants de mêmes parents sont identiques. Leur **corrélation génétique**, qui est égale à la chance de porter le même allèle, est de 1/2.

Si nous transposons ce raisonnement à des individus de même père mais de mères différentes - des demi-frères -, nous obtiendrons des résultats différents. A nouveau, les deux enfants ont 50 pour cent de chance d'hériter un gène identique de leur père, mais cette foisne peuvent hériter le même gène de deux mères différentes. En établissant la moyenne des gènes hérités paternellement et maternellement, on obtient une probabilité de (1/2 + 0)/2 = 1/4 que ces demi-frères portent le même gène.

Nous pourrions être tentés d'utiliser les corrélations théoriques ecxistant entre enfants de mêmes parents pour estimer H^2. Si la corrélation phénotypique observée était de 0,4 et que nous attendons d'un point de vue purement génétique à une corrélation de 0,5, selon la formule $H^2 = s_g^2/s_p^2$ on pourrait estimer l'héritabilité à 0,4/0,5 = 0,8. Cependant une telle estimation ne tient pas compte du fait que les enfants de même parents peuvent être corrélés par le milieu. A moins d'avoir la prudence d'isoler ces enfants dans des milieux indépendants, la valeur estimée de H^2 sera trop grande et pourrait même excéder 1 si la corrélation phénotypique observé est supérieure à 0,5. Pour surmonter ce problème, nous faisons usage des différences entre corrélations phénotypiques déterminées pour différents niveaux de parenté. Par exemple, la

différence de corrélation génétique entre frère et demi-frère est de 1/2 - 1/4 = 1/4. Nous pouvons opposer à ceci leurs **correlations phénotypiques.** Si le milieu est similaire pour les frères et demi-frères - une situation essentielle pour estimer l'héritabilité - les similitudes dues au milieu s'annuleront si nous établissons la différence des corrélations entre les deux types de frères. Cette différence de corrélation phénotypique sera alors proportionnelle à la variance génétique. Donc

$$\begin{bmatrix}\text{Corrélation génétique}\\ \text{entre frères}\end{bmatrix} - \begin{bmatrix}\text{corrélation génétique}\\ \text{entre demi-frères}\end{bmatrix} = 1/4$$

mais

$$\begin{bmatrix}\text{Corrélation}\\ \text{phénotypique}\\ \text{entre frères}\end{bmatrix} - \begin{bmatrix}\text{corrélation}\\ \text{phénotypique}\\ \text{entre demi-frères}\end{bmatrix} = H^2 \times 1/4$$

donc une estimation de H^2 est

$$H^2 = 4\begin{bmatrix}\text{corrélation}\\ \text{entre frères}\end{bmatrix} - \begin{bmatrix}\text{corrélation}\\ \text{entre demi-frères}\end{bmatrix}$$

avec ici la corrélation en tant que corrélation *phénotypique*.

Nous pouvons faire usage d'arguments du même type au sujet des similitudes génétiques entre parents et enfants et entre jumeaux pour obtenir deux autres estimations de H^2 :

$$H^2 = 4\begin{bmatrix}\text{corrélation}\\ \text{entre frères}\end{bmatrix} - 2\begin{bmatrix}\text{corrélation}\\ \text{entre parents et enfants}\end{bmatrix}$$

ou

$$H^2 = 2\begin{bmatrix}\text{corrélation}\\ \text{entre jumeaux}\\ \text{monozygotiques}\end{bmatrix} - \begin{bmatrix}\text{corrélation}\\ \text{entre jumeaux}\\ \text{dizygotiques}\end{bmatrix}$$

Ces formules sont déduites de données concernant les similitudes génétiques entre individus apparentés. Elles ne sont qu'approximatives et dépendent de suppositions sur le mode d'action des gènes. Les deux premières formules, par exemple, supposent que des gènes à des loci différents additionnent leurs effets sur le caractère en cause. La dernière formule implique aussi que les allèles de chaque locus ne présentent pas de dominance (voir la discussion sur les composantes de la variance à la page 842-843).

Toutes ces estimations, comme celles basées sur des corrélations entre individus apparentés, dépendent de *manière critique* de l'hypothèse que les corrélations entre individus dues au milieu sont les mêmes pour tous les degrés de parenté. Si des parents plus proches vivent dans des milieux plus similaires, comme c'est le cas chez l'homme, les estimations d'héritabilité seront faussées. Il est raisonnable d'envisager que la plupart des corrélations entre parents dues au milieu sont positives: dans ce cas les héritabilités seraient surestimées. Des corrélations négatives dues au milieu existent aussi. Par exemple, si les membres d'une même nichée entrent en compétition pour une nourriture fournie en faible quantité, des corrélations négatives en termes de taux de croissance peuvent être observées au sein de ces enfants issus de mêmes parents.

La différence de corrélation entre monozygotiques et dizygotiques est couramment utilisée en génétique humaine pour estimer l'héritabilité de caractères cognitifs ou de personnalité. Dans ce cas, le problème du degré de similitude du milieu est crucial. Des jumeaux vrais (monozygotiques) sont généralement traités de manière plus semblable que ne le sont de faux jumeaux (dizygotiques). Les parents les donnent très souvent un nom similaire, les habillent de la même façon, les traitent de manière identique et en général accentent leurs similitudes. Il en résulte que l'héritabilité est surestimée.

La signification de H^2

L'attention donnée aux procédés d'évaluation de l'héritabilité au sens large nous a détourné de la question plus fondamentale de la signification profonde de ce rapport lorsqu'il peut être calculé. Malgré son usage généralisé en tant que mesure de l'importance des gènes dans le façonnement d'un caractère, H^2 ne revêt en fait qu'une signification particulière et limitée.

Deux conclusions peuvent être tirées d'une étude d'héritabilité bien menée. Premièrement, s'il s'agit d'un cas d'héritabilité non-nulle, cela signifie que dans la population envisagée et dans les milieux au sein desquels les organismes se sont développés, des différences génétiques ont influencé la variation entre individus, de sorte que le caractère est bien concerné par les différences génétiques. Cette constatation est importante et ouvre la voie à une enquête plus approfondie du rôle des gènes. Il nous fait toutefois souligner que le contraire n'est pas vrai. Si le trait ne présente aucune héritabilité, nous n'avons pas démontré que les gènes ne sont pas concernés, mais seulement que dans cette population il n'y a pas de variation génétique des loci impliqués ou que les milieux où se développe cette population sont tels que différents génotypes sont phénotypiquement semblables. Dans d'autres populations ou d'autres milieux, le caractère pourrait être héritable.

Message En général, l'héritabilité d'un caractère est variable selon la population et selon l'ensemble des milieux dans lesquels celle-ci se développe; il n'est donc pas permis d'extrapoler d'une population ou d'un milieu à l'autre.

En outre, nous devons distinguer entre *gènes* concernant le caractère et *des différences génétiques* qui se rapportent aux *différences* constatées dans le caractère. Le phénomène d'immigration en Amérique du Nord a prouvé que la capacité à prononcer les sons de l'anglo-américain, au lieu de ceux du français, du suédois ou du russe, n'est pas la conséquence de différences génétiques entre nos ancêtres immigrants, mais, sans les gènes *ad hoc*, nous ne pourrions parler aucun langage du tout.

Deuxièmement, la valeur de H^2 ne fournit qu'une information limitée sur les effets de la modification du milieu dans des circonstances particulières. Si toute la variation concernée due au milieu est éliminée, et que le nouvel environnement constant est le même que le milieu moyen dans la population de départ, H^2 fournit l'estimation de la valeur de la variation phénotypique qui sera encore présente. Donc, si l'héritabilité des performances à un test

QI est, disons, de 0,4, alors, si tous les enfants vivaient dans les mêmes conditions sociales et de milieu que «l'enfant moyen», environ 60 pourcent de la variation des performances au test QI disparaîtrait et 40% persisterait.

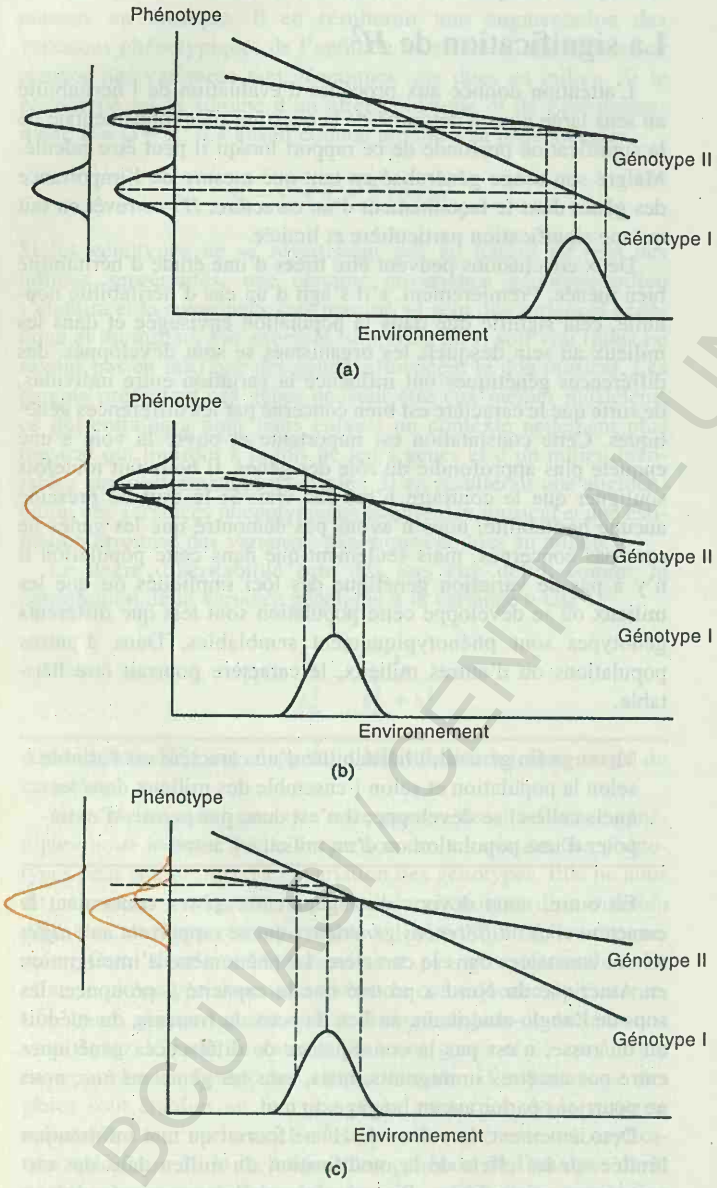


Figure 27-14. La variance génétique peut être modifiée en changeant l'environnement, et la variance due à l'environnement peut être modifiée en changeant les fréquences relatives des génotypes.

Cette prévision requiert que le nouveau milieu constant se situe à la moyenne de la distribution de l'ancien milieu. Si le milieu est déplacé vers l'une ou l'autre extrémité de la distribution du milieu, ou que soit introduit un nouveau milieu, aucune prévision n'est possible. Dans le cas des performance QI, l'héritabilité ne nous fournit aucune information sur le point de savoir quelles seraient les variations dans les performances de ces enfants si leur milieu social et le milieu dans lequel ils se développent étaient enrichis. Pour comprendre qu'il en est bien ainsi, nous devons refaire usage du concept de norme de réaction.

La scission de la variance entre ses composantes génétiques et celles dues au milieu, s_g^2 et s_e^2, ne sépare pas réellement les causes génétiques de la variation de celles liées au milieu. Considérez la figure 27-14, montrant deux génotypes dans une population et leurs normes de réaction. Dans la figure 27-14a, la fréquence des deux génotypes dans la population est supposée identique, et la distribution des milieux (figurée en abscisse) est décalée vers la droite. La distribution des phénotypes (figurée en ordonnée) se compose de deux sous-distributions dont les moyennes sont très différentes et ne montrent qu'une faible variation due au milieu. H^2 a une valeur élevée. A la figure 27-14b, la distribution des milieux a été décalée vers la gauche. Il en résulte que la différence moyenne entre génotypes est nettement moindre. Le point important à souligner ici est que la *variance génétique* a été modifiée en décalant le *milieu*. Dans la figure 27-14c, nous supposons que les milieux sont les mêmes qu'à la figure 27-14b, mais cette fois le génotype II est très commun dans la population et le génotype I plutôt rare. Il s'ensuit que la distribution des phénotypes reflète quasi totalement la norme de réaction I. La population a une variance due au milieu (s_e^2) plus petite que la population de la figure 27-14b en raison de son enrichissement en génotypes les plus stables au cours du développement. Dans ce cas, la variance due au milieu a été modifiée par un changement des génotypes. En général, la variance génétique dépend des milieux auxquels la population est soumise et la variance due au milieu dépend des fréquences des génotypes.

Message Comme le génotype et le milieu interagissent pour modeler un phénotype, aucun partage de la variation ne permet de conclure au partage des causes de cette variation.

En conséquence de ce type d'argument, la connaissance de l'héritabilité d'un caractère ne permet pas de prédire de quelle façon sa distribution se modifiera si les fréquences des génotypes ou celles des facteurs du milieu changent nettement.

Message Une héritabilité élevée ne signifie pas que le caractère en question n'est pas influencé par son environnement.

Comparons, par exemple, les figures 27-14a et b. Tout ce que signifie cette héritabilité élevée se résume à ce que, pour la population particulière se développant dans la distribution particulière de milieux au sein desquels l'héritabilité a été mesurée, les différences moyennes entre génotypes sont grandes comparées aux effets de la variation due au milieu au sein de chaque génotype. Si le milieu se modifie, des différences phénotypiques importantes peuvent en résulter.

Distribution phénotypique finale
Distribution phénotypique finale
Distribution phénotypique finale
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

L'exemple peut-être le plus fameux de l'emploi abusif d'arguments fondés sur l'héritabilité concerne, chez l'homme, les valeurs du QI et la réussite sociale. En 1969, un psychologue de l'éducation, A.R. Jensen, publia un long article dans la *Harvard Educational Review*, posant (dans le titre) la question « Dans quelle mesure pouvons-nous améliorer le QI et les performances scolaires ?» La conclusion de Jensen fut «pas beaucoup». Il donnait comme explication et preuve de cette impuissance à modifier ces caractéristiques, l'héritabilité élevée des valeurs de QI. De nombreuses critiques ont été émises à propos des données présentées par Jensen comme preuve de l'héritabilité élevée des valeurs du QI. Mais indépendamment de l'établissement de la valeur correcte de H^2 pour les performances QI, la véritable erreur de Jensen réside dans l'assimilation qu'il fit d'une héritabilité élevée avec l'absence de possibilité de changement. En fait, l'héritabilité du QI n'a rien à voir avec la question soulevée dans le titre de son article.

Pour établir qu'il en est bien ainsi, considérons les résultats d'une étude sur l'adoption dans laquelle les enfants sont enlevés dans leur enfance à leurs parents biologiques et élevés par leurs parents adoptifs. Quoique les résultats puissent varier quantitativement d'une étude à l'autre, trois caractéristiques communes s'en dégagent. Premièrement, les parents adoptifs ont généralement des QI plus élevés que les parentsbiologiques. Deuxièmement, les enfants adoptés ont des QI plus élevés que leurs parents biologiques. Troisièmement, les enfants adoptés présentent une corrélation plus élevée de leurs valeurs de QI avec leurs parents biologiques qu'avec leurs parents adoptifs.

La table qui suit donne les valeurs hypothétiques de QI pour illustrer ces concepts. Les valeurs données pour les parents sont censées être la moyenne du père et de la mère.

	Enfants	Parents biologiques	Parents adoptifs
	110	90	118
	112	92	114
	114	94	110
	116	96	120
	118	98	112
	120	100	116
	—	—	—
Moyenne	115	95	115

Nous remarquerons tout d'abord que les enfants présentent une corrélation élevée avec leurs parents biologiques mais une corrélation faible avec leurs parents adoptifs. En effet, dans notre exemple hypothétique, la corrélation enfants-parents biologiques est de r = 1,00, mais celle enfants-parents adoptifs est de r = 0. (Rappelez-vous, comme cela est expliqué à la page 824, qu'une corrélation entre deux séries de chiffres ne signifie pas que ces deux séries sont identiques mais qu'à toute augmentation d'une unité dans une série correspond une augmentation proportionnelle dans l'autre). Cette parfaite corrélation avec les parents biologiques alors qu'elle est nulle avec les parents adoptifs entraîne que H^2= 1, en raison des arguments donnés à la page 833. La variation des scores de QI parmi les enfants s'explique par la variation présente chez les parents biologiques.

Cependant, nous observons que chacun des scores du QI des enfants est de 20 points plus élevé que les scores du QI enregistrés chez leurs parents biologiques respectifs et que la moyenne des QI des enfants est égale à la moyenne des QI des parents adoptifs. Donc, l'adoption a eu pour effet d'augmenter la moyenne des QI des enfants de 20 points par rapport au QI moyen de leurs parents biologiques, de telle sorte qu'en tant que groupe, les enfants ressemblent à leurs parents adoptifs. Dans ce cas donc une héritabilité parfaite s'accompagne d'une plasticité élevée du milieu.

Un enquêteur, sérieusement intéressé par le point de savoir comment les gènes peuvent limiter ou influencer le développement d'un caractère chez un organisme, doit envisager l'étude des normes de réaction des différents génotypes de la population dans une gamme d'environnements. Se contenter de données moins précises est vain. Des mesures sommaires comme H^2 ne permettent pas une analyse complète et de ce fait ne sont pas valables en elles-mêmes.

Message L'héritabilité n'est pas le contraire de la plasticité phénotypique. Un caractère peut se distinguer par une héritabilité parfaite dans une population et cependant être sujet à des modifications importantes par suite des variations du milieu.

La détermination des normes de réaction

Il y a remarquablement peu d'information sur les normes de réaction des caractères quantitatifs et cela quelle que soit l'espèce. Ceci est dû en partie à la difficulté de multiplier un génotype chez la plupart des espèces à reproduction sexuée, de telle sorte qu'il puisse être testé dans différents milieux. C'est pour cette raison, par exemple, qu'aucune norme de réaction n'a pu être établie pour aucun génotype de caractère quantitatif chez l'homme.

Cas des plantes et des animaux domestiques

Quelques études sur les normes de réaction ont été menées chez des plantes pouvant être propagées sous forme de clones. Les résultats de l'une de ces expériences sont mentionnés à la page 15. Il est possible de dupliquer des génotypes chez des organismes à reproduction sexuée par la technique d'union entre conjoints apparentés, ou consanguinité. Par autofécondation (là où cette possibilité existe) ou par unions répétées entre frères et soeurs génération après génération, une **lignée ségrégeante** (contenant à la fois des homozygotes et des hétérozygotes pour un locus donné) peut être rendue homozygote.

La création de lignées homozygotes a pour but de produire des ensembles d'organismes dont tous les individus sont génétiquement identiques. Ceux-ci peuvent alors se développer dans des milieux différents pour déterminer une norme de réacion. Alternativement, deux lignées homozygotes différentes peuvent être croisées et les descendants F_1, tous génétiquement identiques les uns aux autres peuvent être suivis dans des milieux différents. Idéalement dans une étude portant sur la norme de réaction tous les individus devraient être strictement génétiquement identiques, mais le processus de consanguinité n'augmente l'homozygotie du groupe que lentement, génération après génération, en rapport

avec la parenté existant entre les individus qui ont été croisés. Chez le maïs, par exemple, on choisit un individu et on l'auto-pollinise. A la génération suivante, un individu unique de sa descendance est à son tour choisi et auto-pollinisé. A la troisième génération, à nouveau un individu unique de la descendance du précédent est choisi et auto-pollinisé, et ainsi de suite. Supposons que l'individu de départ à la première génération soit déjà homozygote pour un locus. Il en résultera que tous ses descendants obtenus par autofécondation seront homozygotes et identiques pour ce locus. Les générations ultérieures issues d'autofécondation préserveront l'homozygotie. Si, par contre, l'individu de départ était hétérozygote, l'autofécondation $Aa \times Aa$ produira 1/4 d'homozygotes *AA* et 1/4 d'homozygotes *aa*. Si un seul descendant est choisi dans la génération suivante pour assurer la propagation de la lignée, il existe 50 pour cent de chances qu'il soit à son tour homozygote. Si, par malchance, l'individu choisi était encore un hétérozygote, il existe à nouveau 50 pour cent de chance que l'individu sélectionné soit homozygote, et ainsi de suite. De l'ensemble de tous les locus hétérozygotes ne subsiste plus, après une génération, qu'une moitié; après deux générations, 1/4; après trois, 1/8. A la $n^{\text{ième}}$ génération

$$\text{Het}_n = \frac{1}{2^n}\,\text{Het}_0$$

où Het_n est la proportion de loci hétérozygotes à la $n^{\text{ième}}$ génération et Het_0 la proportion à la génération 0. Lorsque l'autofécondation n'est pas possible, les unions entre frères et soeurs aboutissent aux mêmes résultats, quoique plus lentement. Le tableau 27-2 compare les niveaux d'hétérozygotie présents après *n* générations d'autofécondation et d'unions entre frères et soeurs.

Cas des populations naturelles

Pour mener à bien l'étude des normes de réaction d'une population naturelle, un grand nombre de lignées sont isolées à partir de la population et des croisements consanguins sont réalisés sur un nombre de générations suffisant pour garantir que chaque lignée soit virtuellement homozygote à tous ses loci. Chaque lignée est alors homozygote à chaque locus pour un allèle sélectionné au hasard dans la population de départ. Les lignées consanguines elles-mêmes ne peuvent être utilisées pour caractériser des normes de réaction de la population naturelle puisque de tels génotypes entièrement homozygotes ne sont pas représentés dans la population originale. Chaque lignée consanguine peut être croisée avec chacune des autres lignées consanguines pour donner lieu à des hétérozygotes reconstituant ainsi la population de départ, et un nombre arbitraire d'individus issus de chaque croisement peut être envisagé. Si la lignée consanguine 1 possède une constitution génétique *A A B B c c d d E E* ... et la lignée consanguine 2 *a a B B C C d d e e* ..., leur croisement fournira un grand nombre de descendants tous identiques *A a B B C c d d E e* ... qui peuvent être élevés dans différents milieux.

La consanguinité par union entre conjoints apparentés au cours de nombreuses générations entraîne l'homozygotie du génome entier. Chez des espèces comme *Drosophila*, où des marqueurs dominants et des suppresseurs de crossing-over sont disponibles, il est possible d'obtenir des lignées qui soient homozygotes pour un seul chromosome, plutôt que pour leur ensemble, comme décrit à la figure 27-15 dans le cas d'un autosome. Un mâle unique est choisi dans la population et croisé avec une femelle dont un chromosome porte un suppresseur *C* de crossing-over (habituellement, une inversion complexe), un récessif léthal *l*, et un marqueur dominant visible M_1 hétérozygote accompagné d'un second marqueur dominant visible M_2. Dans la F_1, un *seul* mâle portant le chromosome ClM_1 est sélectionné. Ce mâle, qui comporte aussi un chromosome sauvage présent dans la population, est croisé à nouveau avec le stock marqueur. En F_2, toutes les mouches exprimant le caractère M_1 mais non le caractère M_2, sont nécessairement toutes hétérozygotes pour le chromosome sauvage originel puisque ClM_1/ClM_1 est léthal et qu'aucun crossing-over ne se produit. En F_3, toutes les mouches sauvages sont homozygotes et identiques en ce qui concerne le chromosome sauvage et peuvent être utilisées pour établir un stock destiné à des études de normes de réaction et de croisement.

La figure 27-16 montre les normes de réaction du nombre de soies abdominales en fonction de la température pour des homozygotes du chromosome deux de *Drosophila pseudoobscura*. De même que les normes du taux de croissance chez *Achillea* (figure 1-18), les normes s'entrecroisent, différents génotypes ayant des maxima de température différents. Les hétérozygotes (les génotypes présents dans la nature) sont plus semblables entre eux que les homozygotes pour un chromosome qui ne se présentent que rarement, voire jamais, dans une population naturelle.

Tableau 27-2. Niveau d'hétérozygotie après plusieurs générations de consanguinité dans le cas de deux systèmes d'appariement.

	Niveau d'hétérozygotie	
Génération	Autofécondation	Croisement frère-soeur
0	1,000	1,000
1	0,500	0,750
2	0,250	0,625
3	0,125	0,500
4	0,0625	0,406
5	0,03125	0,338
10	0,000977	0,114
20	$1{,}05 \times 10^{-6}$	0,014
n	$\text{Het}_n = 1/2\ \text{Het}_{n-1}$	$\text{Het}_n = 1/2\ \text{Het}_{n-1} + 1/4\ \text{Het}_{n-2}$

Résultats des études sur les normes de réaction

Très peu d'études de normes de réaction ont été menées sur des caractères quantitatifs avec les génotypes normalement hétérozygotes des populations naturelles. Seules les espèces où des croisements consanguins peuvent être facilement réalisés, comme le maïs ou *Drosophila*, et des espèces à multiplication clonale comme les fraisiers, ont été étudiées jusqu'à un certain point. Les résultats de telles études ressemblent à ceux présentés à la figure 27-16. Aucun génotype n'est régulièrement au-dessus ou en-dessous des autres génotypes ; il y a en fait de petites différences d'un génotype à l'autre, et la tendance de ces différences n'est pas uni-

BCU LAUSANNE CENTRAL

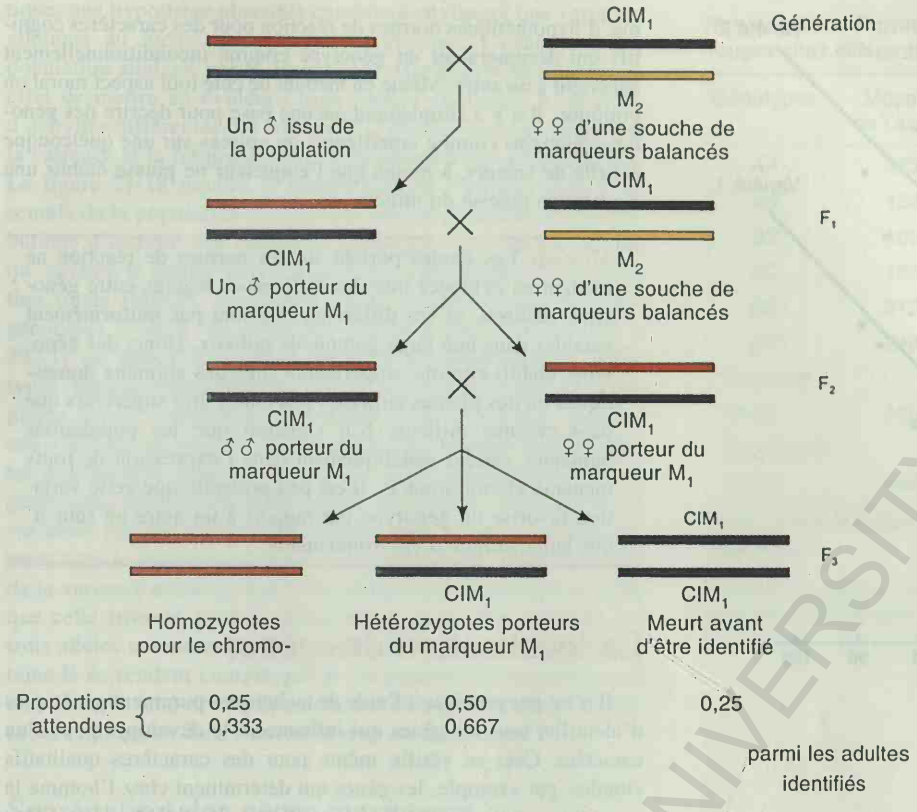


Figure 27-15. Méthode pour obtenir des homozygotes autosomiques en utilisant des gènes marqueurs dominants, M_1 et M_2, un suppresseur de crossing-over, C, et un gène létal, l.

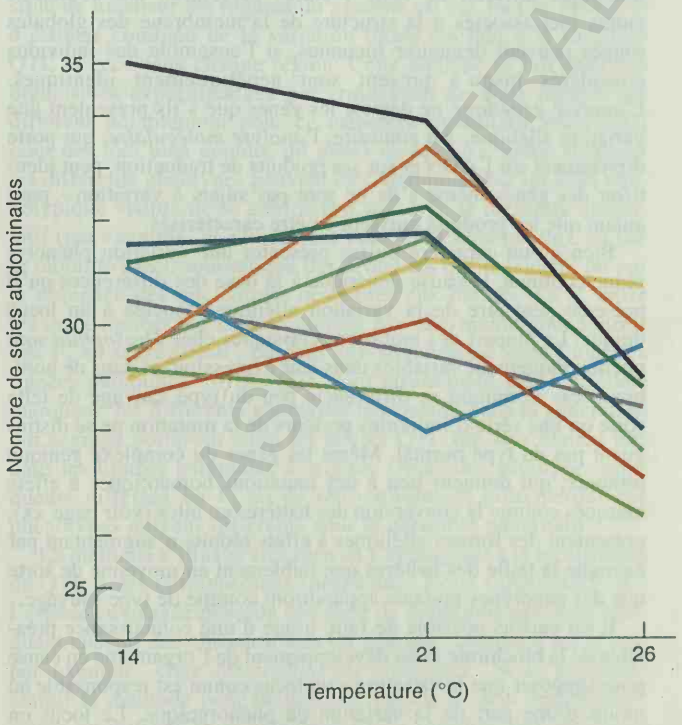


Figure 27-16. Le nombre de soies abdominales chez différents génotypes homozygotes de *Drosophila pseudoobscura* élevés à trois températures différentes. (Données obtenues grâce à A.P. Gupta).

forme d'un bout à l'autre d'un large éventail d'environnements.

Ces faits ont deux conséquences importantes. Premièrement, la sélection de génotypes «supérieurs» chez les animaux domestiques et les plantes cultivées aboutira à des variétés très spécifiquement adaptées et qui n'affirmeront peut-être pas leur supériorité si on les transpose dans d'autres milieux. Ce problème peut être surmonté, jusqu'à un certain point, en testant délibérément les génotypes dans une série de milieux (par exemple, sur plusieurs années et à plusieurs endroits). Il serait même préférable que les sélectionneurs végétaux puissent tester leurs produits de sélection dans une gamme de milieux contrôlés, où chaque facteur du milieu pourrait être manipulé séparément. Les conséquences des protocoles d'amélioration des plantes appliqués à l'heure actuelle sont décrites à la figure 27-17, où les rendements de deux variétés de maïs sont comparés en fonction des modes de culture. La variété 1 est une variété ancienne de maïs hybride; la variété 2 est une variété hybride «améliorée» ultérieurement». Leurs performances sont comparées à une densité de semis faible (qui prévalait lorsque la variété 1 fut développée) et à une densité de semis élevée qui était caractéristique de la pratique agricole lorsque l'hybride 2 fut sélectionné. A densité élevée, la nouvelle variété domine clairement l'ancienne, dans tous les types de milieu (figure 27-17a). A faible densité, cependant, la situation est tout à fait différente. Notez, tout d'abord, que la nouvelle variété est moins sensible au milieu que l'ancien hybride, comme le montre sa norme de réaction plus étalée. Deuxièmement, la nouvelle variété améliorée est en fait moins performante dans les meilleures conditions de culture. Troisièmement, l'augmentation de rendement de la nouvelle variété ne se manifeste pas dans des conditions de culture à basse densité comme pratiquées dans le passé.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

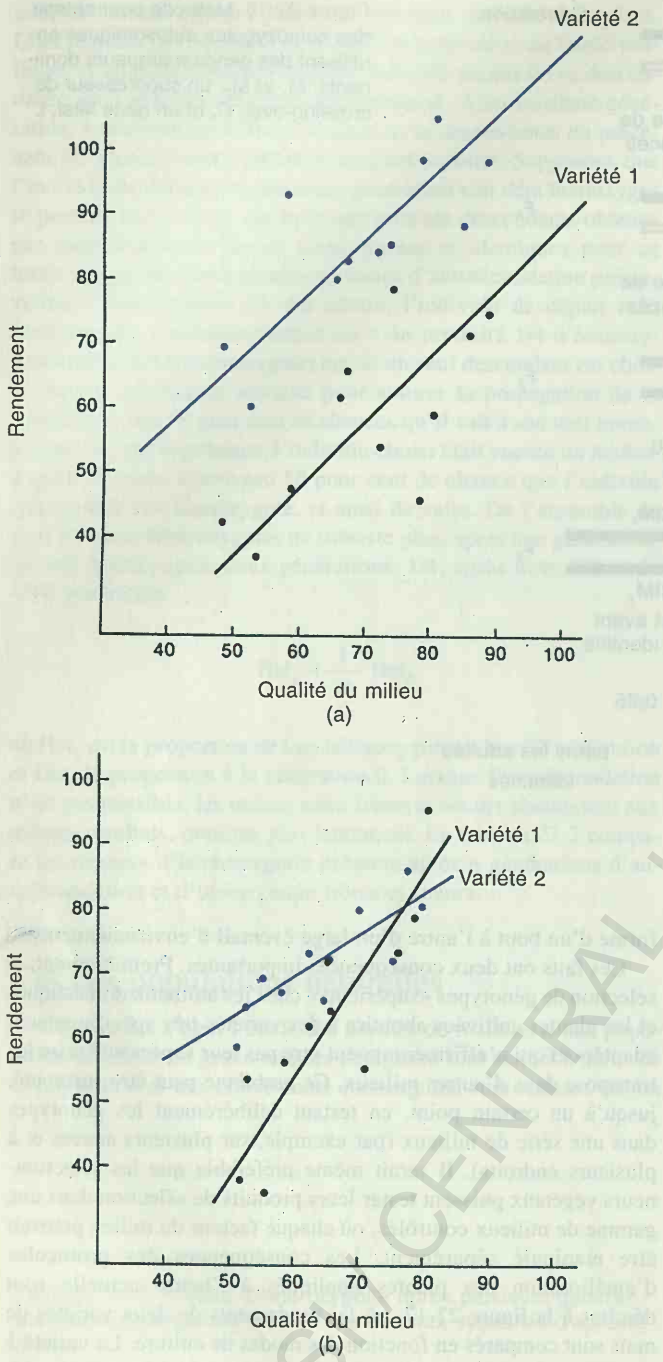


Figure 27-17. Rendements en grain de deux variétés de maïs dans des milieux différents: (a) à densité de semis élevée; (b) à densité de semis faible. (Données obtenues grâce à W.A. Russell, *Proceedings of the 29th Annual Corn and Sorghum Research Conference*, 1974).

La deuxième conséquence de la nature même des normes de réaction est que, même s'il s'avérait qu'une variation génétique sous-tende certains caractères mentaux et émotionnels chez l'homme (ce qui n'est pas du tout évident), il est peu probable que cette variation favorise un génotype plutôt qu'un autre dans toute une gamme d'environnements. Nous devons nous méfier, chez l'homme, d'hypothétiques normes de réaction pour des caractères cognitifs qui désigneraient un génotype comme inconditionnellement supérieur à un autre. Même en mettant de côté tout aspect moral ou politique, il n'y a simplement aucune base pour décrire des génotypes humains comme «meilleurs» ou «pires» sur une quelconque échelle de valeurs, à moins que l'enquêteur ne puisse établir une description précise du milieu.

Message Les études portant sur les normes de réaction ne mettent en évidence que des différences légères entre génotypes naturels, et ces différences ne sont pas uniformément valables dans une large gamme de milieux. Donc, des génotypes établis comme «supérieurs» chez des animaux domestiques ou des plantes cultivées peuvent n'être supérieurs que dans certains milieux. S'il s'avérait que les populations humaines varient génétiquement dans l'expression de traits mentaux et émotionnels, il est peu probable que cette variation favorise un génotype par rapport à un autre au sein d'une large gamme d'environnements.

La localisation des gènes

Il n'est pas possible à l'aide de techniques purement génétiques d'identifier tous les gènes qui influencent le développement d'un caractère. Ceci se vérifie même pour des caractères qualitatifs simples, par exemple, les gènes qui déterminent chez l'homme la constitution antigénique de la membrane du globule rouge. Une quarantaine de loci au moins sont impliqués dans la détermination des groupes sanguins; chacun d'entre eux a été découvert par l'identification d'au moins une personne dont la spécificité immunologique différait de celle d'autres personnes. De nombreux autres loci associés à la structure de la membrane des globules rouges peuvent demeurer inconnus, si l'ensemble des individus considérés jusqu'à présent sont génétiquement identiques. L'*analyse génétique* ne détecte les gènes que s'ils présentent une variation allélique. Au contraire, l'*analyse moléculaire*, qui porte directement sur l'ADN et sur ses produits de traduction, peut identifier des gènes même s'ils ne sont pas sujets à variation - pour autant que les produits puissent en être caractérisés.

Bien qu'un caractère puisse présenter une variation phénotypique continue, la cause génétique à la base des différences qu'il présente peut être de la variation allélique associée à un locus unique. La plupart des mutations classiques chez *Drosophila* sont phénotypiquement variables dans leur expression, et dans de nombreux cas le mutant se différencie peu du type sauvage de telle sorte qu'une série d'individus porteurs de la mutation ne se distinguent pas du type normal. Même les gènes du complexe génique bithorax, qui donnent lieu à des mutations homéotiques à effets marqués comme la conversion des haltères en ailes (voir page xx), présentent des formes alléliques à effets réduits n'augmentant par exemple la taille des haltères que faiblement en moyenne de sorte que des génotypes mutants apparaîtront comme de type sauvage.

Il est parfois possible de faire usage d'une connaissance préalable de la biochimie et du développement de l'organisme en cause pour supposer que la variation à un locus connu est responsable au moins d'une part de la variation du phénotypique. Le locus en question est donc un *gène candidat* dans le cadre de l'étude de la variation phénotypique continue. Un exemple concerne la variation de l'activité de la phosphatase acide chez des globules rouges de l'homme. Puisqu'il s'agit d'une variation d'activité enzyma-

BCU LAUSANNE / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

tique, une hypothèse plausible consiste à envisager une variation allélique au locus codant pour cet enzyme. L'examen d'une population anglaise par H. Harris et D. Hopkinson leur permit en effet de mettre en évidence trois formes alléliques A, B et C, d'activités différentes. Le tableau 27-3 donne l'activité moyenne, la variance et la fréquence dans la population des six génotypes. La figure 27-18 montre la distribution de l'activité dans l'ensemble de la population et comment elle est composée des distributions d'activité des différents génotypes. Le tableau indique qu' environ la moitié de la variance de l'activité dans la distribution totale (607,8), s'explique par la variance moyenne entre génotypes (310,7), de sorte que l'autre moitié (607,8-310,7 = 297,1) est due à la variance entre les moyennes des six génotypes. Bien qu'une grande part de la variation de l'activité s'explique par les différences moyennes entre génotypes, subsiste une variation au sein de chaque génotypes pouvant être le résultat d'influences dues au milieu ou de la ségrégation d'autres gènes non encore identifiés. Cette explication partielle de la variation par des allèles d'un simple locus se retrouve typiquement dans le cas de la méthode du gène candidat, et la proportion de la variance associée à ce locus unique est en général moindre que celle trouvée pour la phosphatase acide. Par exemple, les trois allèles communs du gène *apoE* qui code pour l'apolipoprotéine E ne rendent compte que de 16 pourcent de la variance du taux dans le sang de ces lipoprotéines transporteurs de cholésterol et impliquées dans l'excès du taux de cholésterol.

Tableau 27-3. Activité de la phosphatase acide des globules rouges chez différents génotypes dans la population anglaise.

Génotypes	Moyenne de l'activité	Variance de l'activité	Fréquence dans la population
AA	122,4	282,4	,13
AB	153,9	229,3	,43
BB	188,3	380,3	,36
AC	183,8	392,0	,03
BC	212,3	533,6	,05
CC	240	–	,002
Moyenne totale	166,0	310,7	
Distribution totale	166,0	607,8	

Note : Les moyennes sont estimées par leur fréquence dans la population.

Source : H. Harris, The Principle of Human Biochemical Genetics, 3ième édition © 1970, North Holland

Segrégation des gènes marqueurs.

Les gènes ségrégeant pour un caractère quantitatif , appelés loci de caractères quantitatifs ou QTL, ne peuvent la plupart du temps pas être identifiés individuellement. Cependant, il est possible de localiser les régions du génome où ces loci se situent et d'estimer combien de la variation totale est due à la variation QTL et ceci dans chaque région. Cette analyse se fait chez des organismes expérimentaux par croisement de deux lignées qui diffèrent notablement pour ce caractère quantitatif mais aussi pour des loci bien connus, dit *gènes marqueurs*, grâce auxquels les différents génotypes peuvent être distingués par un effet phénotypique visible ne se confondant pas avec le caractère quantitatif (par exemple, la couleur des yeux chez *Drosophila*), ou par la mobilité électrophorétique des protéines qu'ils codent, ou par la séquence des nucléotides des gènes eux-mêmes. La F_1 entre les deux lignées est ensuite croisée par elle-même pour fournir une F_2 en ségrégation , ou peut être rétrocroisée avec l'une des lignées parentales. Si des QTL sont étroitement liés à un gène marqueur, les différents génotypes marqueurs dans la génération qui ségrège porteront aussi les allèles QTL qui leur étaient liés dans les lignées parentales d'origine. Donc, des génotypes marqueurs différant en F_2 ou en rétrocroisement présenteront des phénotypes moyens différents pour le caractère quantitatif.

La méthode s'illustre très bien en l'appliquant à la localisation de QTL à des chromosomes spécifiques. Nous supposerons que l'espèce envisagée possède une série de mutations géniques marquant chacun des chromosomes du génome, comme c'est le cas, par exemple, chez *Drosophila melanogaster*. Nous pourrions élargir la méthode pour définir des régions au sein des chromosomes en utilisant la grande quantité de variation des séquences d'ADN présente chez tous les organismes (voir à ce sujet la section sur l'analyse de la liaison, page 841).

Pour trouver les chromosomes sur lesquels se situent les QTL chez une espèce bien pourvue en marqueurs génétiques comme *Drosophila melanogaster*, nous envisagerons d'abord deux populations qui divergent fortement pour le caractère. Il peut s'agir de deux populations naturelles, mais plus généralement il s'agit de deux sous-populations créées par sélection artificielle. Par exemple, dans une sous-population, les individus les plus

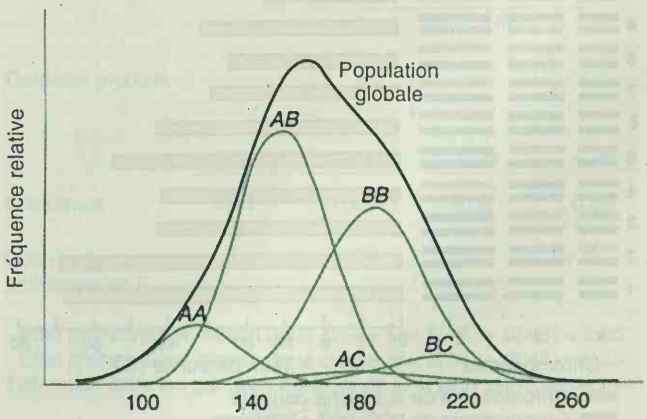


Figure 27-18. Activité de la phosphatase acide de globules rouges de différents génotypes et distribution de l'activité dans une population anglaise constituée d'un mélange de ces génotypes (H. Harris, The Principle of Human Biochemical Genetics, 3ième édition © 1970, North Holland)

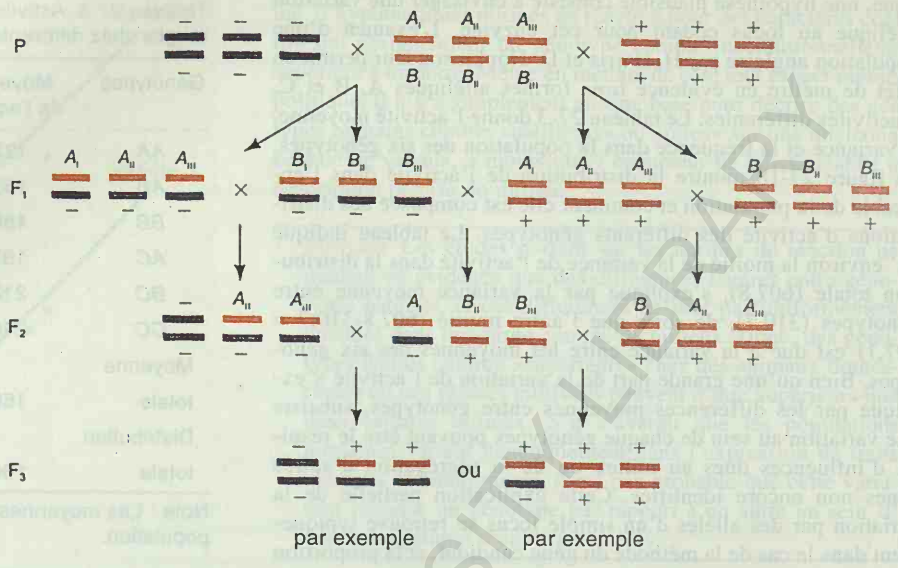


Figure 27-19. Schéma de croisements effectués pour obtenir des individus présentant différentes combinaisons de chromosomes à partir d'une lignée fortement sélectionnée (+) et d'une lignée faiblement sélectionnée (-). A_1, B_1,... sont des suppresseurs dominants de crossing-over.

grands sont choisis comme parents à chaque génération; dans l'autre, les individus les plus petits. Au cours des générations, la lignée sélectionnée pour les grandes tailles s'enrichira en allèles déterminant une taille plus élevée, tandis que les allèles associés à une petite taille s'accumuleront dans la lignée sélectionnée pour cette caractéristique. Si cette sélection se poursuit suffisamment longtemps, les deux populations deviennent virtuellement homozygotes pour les allèles «grand» et «petit» D'une autre façon, des lignées consanguines pourraient être obtenues à partir de la population de départ, et les lignées les plus divergentes choisies comme représentant les populations «grandes» et «petites». Quelle que soit la méthode utilisée, les deux populations divergentes ne seront probablement différentes que pour les loci déjà hétérozygotes à un certain degré dans la population de départ.

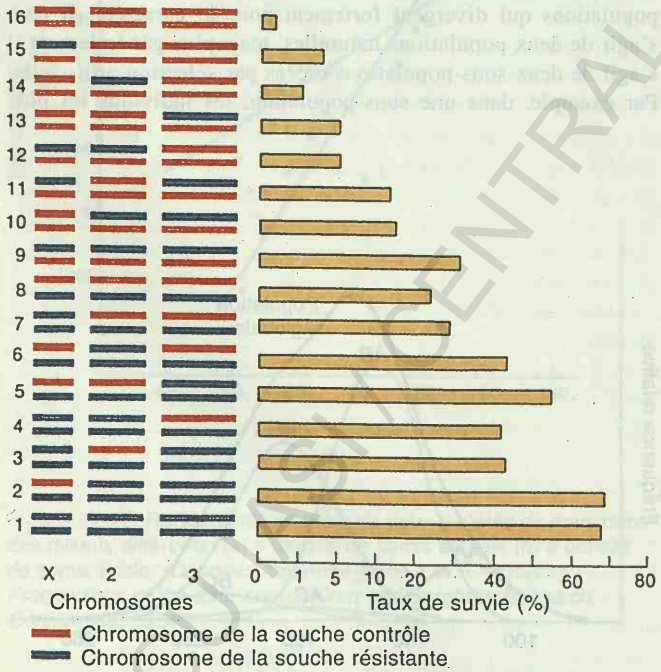


Figure 27-20. Taux de survie de génotypes de *Drosophila melanogaster* présentant différentes combinaisons de chromosomes issus d'une lignée sélectionnée (souches résistante) et d'une lignée non-sélectionnée (souche contrôle). Les chromosomes résistants proviennent de souches sélectionnées pour leur résistance au DDT. (Selon J. Crow, *Annual Review of Entomology* 2, 1957, 228).

L'obtention de lignées divergentes va permettre de substituer chaque chromosome d'une des lignées par un de l'autre lignée en utilisant des stocks à marqueurs dominants comportant des suppresseurs de crossing-over. La méthode idéale est représentée à la figure 27-19; A_I, A_{II}, A_{III}, B_I,...y représentent des marqueurs dominants pour les chromosomes I, II, et III. Des mesures du caractère sont effectuées chez des lignées homozygotes et hétérozygotes pour les différentes combinaisons de chromosomes "+" "+" et "–" "–" pour déterminer la contribution de chaque chromosome aux différences génétiques existant entre les lignées. Un exemple d'une telle technique est l'étude par J. Crow de la résistance au DDT chez *Drosophila melanogaster* (figure 27-20). Crow n'a pas établi de lignées homozygotes pour les chromosomes "+" "+" et "–" "–" et les effets des chromosomes ne sont estimés que dans des lignées hétérozygotes. La figure montre que chaque chromosome comporte apparemment quelques gènes qui diffèrent entre la lignée résistante et la lignée sensible.

Action des gènes

Le problème que pose l'identification des loci influençant des caractères quantitatifs est intimement lié à l'importance de l'effet des différentes substitutions d'allèles, du degré de dominance des allèles à chaque locus, et à l'importance de l'épistasie d'un locus par rapport aux autres. Les méthodes décrites à la section précédente sont biaisées en ce sens qu'elles conduisent à identifier des loci pour lesquels les différences entre allèles sont importantes. Il peut y avoir de nombreux loci qui, au sein du groupe, contribuent

POLYTECHNIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fortement à la variation génétique du carctère, mais qui ne peuvent être ni situés ni caractérisés individuellement en raison de l'effet réduit dû à chacune de leurs substitutions alléliques.

Cependant, même sans être capable de localiser ces gènes, l'on peut obtenir quelque information sur leurs actions et interactions. En comparant des homozygotes et des hétérozygotes obtenus par substitution de chromosomes, nous pouvons estimer la dominance moyenne au niveau chromosomique. A la figure 27-20, la comparaison des lignées 1 et 2 montre que les chromosomes X ne sont pas différents dans leurs effets, alors que la comparaison entre les lignées 15 et 16 amène à penser qu'ils provoquent un effet différent. Une explication possible de ce désaccord pourrait être la dominance complète des allèles résistants sur les allèles sensibles.

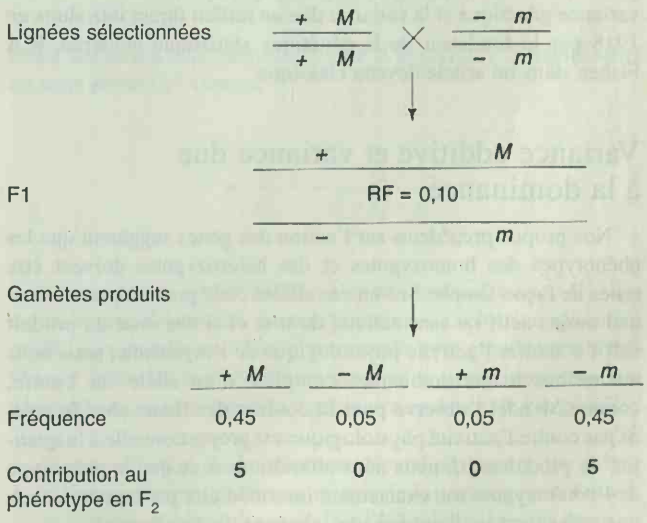
Des interactions spécifiques de type épistatique ont aussi été mises en évidence. La lignée 5 comporte à la fois les substitutions des lignées 2 et 3 et devrait être au moins aussi sensible que la lignée 3, alors qu'elle est intermédiaire entre 2 et 3. Il semblerait que l'hétérozygotie d'un chromosome X sensible diminue cette sensibilité si elle se produit en combinaison avec l'hétérozygote d'un deuxième chromosome sensible. De telles données sur la dominance ou l'épistasie de chromosomes entiers ne donnent qu'un aperçu indirect de l'action individuelle des gènes puisque dans le cas de dominance ou d'épistasie marquée, l'effet important d'un seul gène peut masquer les effets réduits de plusieurs autres gènes.

Des effets non-nucléaires peuvent être aussi dénotés dans ces expériences de substitutions de chromosomes. Par exemple, à la figure 27-20, les lignées 8 et 9, dont la résistance est différente, possèdent la même constitution chromosomique mais sont le produit de croisements réciproques et sont donc caractérisées par un cytoplasme différent.

Analyse de cas de liaison génétique ou "linkage"

La localisation de QTL sur des petites régions au sein des chromosomes demande que les loci marqueurs soient régulièrement répartis sur le chromosome. En outre, il est nécessaire que les lignées parentales diffèrent l'une de l'autre pour les allèles présents à ces loci. Pendant la plus grande partie de l'histoire de la génétique, ces exigences n'ont pas pu être réalisées, même chez une espèce comme *Drosophila*. En effet, la plupart des loci marqueurs concernaient des mutants morphologiques dont la viabilité et la fécondité étaient sensiblement diminuées. Il en est résulté l'impossibilité de créer une lignée porteuse d'un grand nombre d'allèles mutants qui se distinguerait d'une autre lignée portant les allèles sauvages. Avec la venue de techniques moléculaires permettant de détecter le polymorphisme génétique de l'ADN (voir pages 784-87) une très grande densité de loci variants ont été découverts le long des chromosomes de toutes les espèces. Se sont avérés particulièremeent utiles le polymorphisme des sites de restriction et les répétitions en tandem dans l'ADN (voir page 484-486, 505, et page 784-85). De tels polymorphismes sont tellement répandus que n'importe quelles deux lignées choisies parce que différentes dans leurs caractères quantitatifs, sont sûrement différentes l'une de l'autre pour des marqueurs moléculaires séparés par une très coûrte distance les uns des autres le long de chacun des chromosomes.

Le protocole expérimental est similaire à celui utilisé dans l'expérience concernant les chromosomes. Deux lignées divergeant pour le caractère quantitatif sont sélectionnées. Ici il n'est pas nécessaire d'introduire des marqueurs dominants, puisque les lignées diffèrent par des marqueurs ADN identifiables. Après un croisement entre ces deux lignées, la F_1 est autofécondée pour donner lieu à une F_2, ou rétrocroisée avec l'une des lignées parentales. Les deux descendances ségrègent et un grand nombre d'individus dans les descendances sont à la fois utilisées pour mesurer le caractère quantitatif et pour caractériser les marqueurs. Un locus marqueur qui n'est pas lié ou très lâchement lié à l'un des QTL présentera la même valeur moyenne du caractère quantitatif pour tous ses génotypes. Au combien différent est le phénotype moyen au sein des génotypes des marqueurs dépend à la fois de l'importance de l'effet des QTL et de l'étroitesse de la liaison entre les QTL et le locus marqueur. Supposons que deux lignées selectionnées diffèrent, disons, de 100 unités pour un caractère quantitatif et que la lignée de grande taille est homozygote + + au locus QTL concerné alors que la lignée de faible taille est homozygote – – et que chaque allèle + prend en compte 5 unités de la différence totale entre les deux lignées. Supposons en outre que la grande lignée est *MM* et la petite lignée *mm* pour un locus marqueur situé à 10 unités de crossing-over du locus QTL. Alors, comme la Figure 27-



Effet phénotypique moyen de la classe *M* = 5(,45) + 0(,05) = 2,25
Effet phénotypique moyen de la classe *m* = 5(,05) + 0(,45) = 0,25
Différence entre les gamètes porteurs de *M* et ceux porteurs de *m* = 2,25 – 0,25 = 2
Différence entre les homozygotes *MM* et *mm* = 4

Figure 27-21. Résultat d'un croisement entre deux lignées sélectionnées qui diffèrent par un QTL et un marqueur moléculaire situé à 10 unités de crossing-over du QTL. L'allèle QTL + joue sur le phénotype par addition de 5 unités.

21 le montre, une différence de 2 unités existe entre la moyenne des gamètes porteurs d'un allèle M et ceux porteurs d'un allèle m dans la population F_2, ou encore de 4 unités entre les lignées homozygotes. Donc, nous avons rendu compte de 4 pourcent de différences entre les moyennes des lignées, alors que généralement les QTL sont redevables de 10 pourcent de la différence. Cette divergence est due à la recombinaison qui se produit entre le gène marqueur et le QTL.

Cette technique a été mise en oeuvre pour localiser des segments de chromosomes associés à des caractères comme le poids d'un fruit de tomate et le nombre de soies chez *Drosophila*. Classiquement chaque région marqueur ne déterminera qu'un faible pourcentage de l'effet total du caractère, mais prises toutes ensemble plus de la moitié des différences entre lignées peuvent être justifiées. Malheureusement, en génétique humaine, bien que la ségrégation de gènes marqueurs puisse être utilisée pour tenter de localiser des disfonctionnements de gènes uniques, la faible ampleur d'un arbre généalogique rend cette méthode inapplicable à des loci codant pour des caractères quantitatifs.

Analyse approfondie de la variance

La connaissance de l'héritabilité au sens large (H^2) d'un caractère dans une population n'est pas très utile en soi, mais une subdivision plus fine de la variance phénotypique peut fournir une information intéressante pour les sélectionneurs et les éleveurs. La variation génétique et celle due à l'environnement peuvent elles-mêmes être subdivisées de telle façon à fournir une information sur l'action des gènes et les possibilités de modeler la composition génétique d'une population. Les concepts servant à subdiviser la variance génétique et la variance due au milieu furent introduits en 1918 par le fondateur de la génétique statistique moderne, R.A Fisher, dans un aritcle devenu classique.

Variance additive et variance due à la dominance

Nos propos précédents sur l'action des gènes suggèrent que les phénotypes des homozygotes et des hétérozygotes doivent être reliés de façon simple. Si l'un des allèles code pour un produit normal moins actif ou sans activité du tout et si une dose du produit suffit à assurer l'activité physiologique de l'organisme, nous nous attendrions à une dominance complète d'un allèle sur l'autre, comme Mendel l'observa pour la couleur des fleurs chez le pois. Si par contre l'activité physiologique est proportionnelle à la quantité de produit actif, nous nous attendrions à ce que le phénotype de l'hétérozygote soit exactement intermédiaire par rapport à ceux que présentent les homozygotes (absence de dominance).

Pour de nombreux caractères quantitatifs, aucune de ces règles simples n'est d'application. En général, les hétérozygotes ne se situent pas exactement entre les deux homozygotes, mais sont plus proches de l'un ou de l'autre (cas de dominance partielle). La complexité des voies biosynthétiques et des réseaux de développement est telle que le phénotype d'un hétérozygote peut ne pas être intermédiaire, même s'il contient un mélange en proportions égales des produits primaires des deux allèles. Au contraire, le phénotype de l'hétérozygote peut se situer en dehors de la gamme des phénotypes des homozygotes - une circonstance appelée **surdominance**. Par exemple, des nouveaux-nés de taille intermédiaire ont une plus grande chance de survie que des nouveau-nés particulièrement grands ou petits. Donc, si nous considérons le phénotype «survie», ces hétérozygotes pour les gènes influençant le taux de croissance exprimeront la surdominance.

Supposons que deux allèles, *a* et *A*, à un locus contrôlant la taille ségrègent. Dans les milieux où la population se trouve, les phénotypes moyens (hauteurs) et la fréquence des trois génotypes pourraient être :

	aa	*Aa*	*AA*
Phénotype	10	18	20
Fréquence	0,36	0,48	0,16

La population présente une variance génétique; les moyennes phénotypiques des trois classes de génotypes sont différentes. Une partie de la variance est due à l'effet moyen sur le phénotype de la substitution d'un allèle *A* par un allèle *a*; c'est-à-dire que la taille moyenne de tous les individus possédant l'allèle A est plus élevée que celle de tous les individus possédant l'allèle *a*. En définissant l'effet moyen d'un allèle comme le phénotype moyen de tous les individus qui le possèdent,nous faisons dépendre l'effet moyen de l'allèle des fréquences des génotypes.

L'effet moyen se calcule par comptage des allèles *A et a* et en les multipliant par les hauteurs des individus chez lesquels ils sont présents. Donc, 36% de tous les individus sont homozygotes *aa*, chaque individu *aa* possède deux allèles *a* et la hauteur moyenne des individus *aa* est de 10 cm. Les hétérozygotes représentent 48% de la population, chacun d'entre eux n'a qu'un allèle *a*, et la moyenne des tailles des individus *Aa* est de 18 cm. Le nombre total d'allèles *a* est de 2 (0,36) + 1 (0.48). Donc, l'effet moyen de tous les allèles *a* est

$$\bar{a} = \text{effet moyen de } a = \frac{2(0,36)(10) + 1(0,48)(18)}{2(0,36) + 1(0,48)}$$

$$= 13,20 \text{ cm}$$

et, de même

$$\bar{A} = \text{effet moyen de } A = \frac{2(0,16)(20) + 1(0,48)(18)}{2(0,16) + 1(0,48)}$$

$$= 18,80 \text{ cm}$$

Cette différence moyenne de 5,60 cm entre les effets dus aux allèles *A* et *a* ne rend compte que d'une partie de la variance du phénotype. L'hétérozygote n'est pas exactement intermédiaire par rapport aux homozygotes; il y a un certain effet de dominance.

Nous aimerions distinguer la part de la variation au sein des génotyeps du à la substitution des allèles *a* aux allèles *A*(ce qui est désigné comme l'**effet additif** des allèles), de la variation due à la dominance. La raison en est que l'effet de la selection dépend de la variation additive et non de la variation due à la dominance. Donc, dans le cas de l'amélioration des végétaux et des animaux ou devont prédire ce que sera l'évolution par selection natruelle,

nous devons faire appel à la variation additive. Illustrons ceci par un cas extrême. Supposons qu'il y ait surdominance et que les moyennes phénotypiques et les fréquences des trois génotypes soient

	AA	*Aa*	*aa*
Phénotype	10	12	10
Fréquence	0,25	0,50	0,25

Il ressort (et un calcul identique au précédent le confirmerait) qu'il n'y a pas de différence entre les effets des allèles *A* et *a*, puisque chacun d'eux détermine un effet de 11 unités. Il n'y a donc pas de variation *additive,* quoiqu'une variation phénotypique soit présente au sein des génotypes. Les individus les plus grands sont hétérozygotes. Si un sélectionneur s'efforce d'augmenter la taille de cette population par sélection, l'union de ces hétérozygotes ne donnera lieu qu'à la population originelle. La sélection sera totalement inopérante. Ceci illustre bien la loi générale selon laquelle l'effet de la sélection dépend de la variation génétique *additive* et non de la variation génétique en général.

Nous subdivisons la variance génétique totale d'une population en d'une part la **variation génétique additive** s_a^2, la variance due à l'existence d'une différence moyenne entre les porteurs des allèles a et des allèles A, et d'autre part, la **variance due à la dominance** s_d^2, qui résulte de ce que les hétérozygotes ne sont pas exactement intermédiaires par rapport aux homozygotes. Donc

$$s_g^2 = s_a^2 + s_d^2$$

Les composantes de la variance dans le prmier ensemble où $aa = 10$, $Aa = 18$, et $AA = 20$, peuvent être calculées en utilisant les définitions de la moyenne et de la variance présentées plus tôt dans ce chapitre. En vous rappelant qu'une moyenne est la somme des valeurs prises par une variable, chacune d'entre elles étant pondérée par la fréquence avec laquelle elle apparaît (voir page ...), nous pouvons calculer la moyenne phénotypique comme suit :

$$\bar{x} = \Sigma f_i x_i = (0{,}30)(10) + (0{,}48)(18) + (0{,}16)(20)$$

$$= 15.44 \text{ cm}$$

La variance génétique totale issue de la variation parmi les phénotypes moyens des trois génotypes est

$$s_g^2 = \Sigma f_i (x_i - \bar{x})^2 = (0{,}36)(10 - 15{,}44)^2 + (0{,}48)(18 - 15{,}44)^2 + (0{,}16)(20 - 15{,}44)^2$$

$$= 17.13 \text{ cm}$$

La fréquence de l'allèle *a* (obtenue en comptant les allèles) est

$$f_a = \frac{2(aa) + 1(Aa)}{2}$$

$$= \frac{2(0{,}36) + 1(0{,}48)}{2} = 0{,}60$$

et la fréquence de l'allèle A

$$f_A = \frac{2(AA) + (Aa)}{2}$$

$$= \frac{2(0{,}16) + (0{,}48)}{2} = 0{,}40$$

La variance des moyennes alléliques est alors

$$s^2 = f_a(\bar{a} - \bar{x})^2 = f_A(\bar{A} - \bar{x})^2$$

$$= (0{,}60)(13{,}20 - 15{,}44)^2 + (0{,}40)(18{,}80 - 15{,}44)^2$$

$$= 7{,}525 \text{ cm}^2$$

Mais, nous désirons obtenir la variance au sein des individus diploïdes, résultant des effets alléliques, et comme chaque individu diploïde est porteur de deux allèles,

$$s_a^2 = (2)(7{,}525) = 15{,}05 \text{ cm}^2$$

et

$$s_d^2 = s_g^2 - s_a^2 = 17{,}13 - 15{,}05 = 2{,}08 \text{ cm}^2$$

La variance phénotypique totale peut maintenant s'écrire

$$s_p^2 = s_g^2 + s_e^2 = s_a^2 + s_d^2 + s_e^2$$

Nous définirons une nouvelle forme d'héritabilité, **l'héritabilité au sens étroit (h^2)** comme

$$h^2 = \frac{s_a^2}{s_p^2} = \frac{s_a^2}{s_a^2 + s_d^2 + s_e^2}$$

C'est cette forme d'héritabilité - à ne pas confondre avec H^2 - qui est utile pour déterminer si un programme de sélection réussira à modifier la population. Plus h^2 est grande, plus grande sera la différence entre les parents sélectionnés et la population dans son ensemble qui sera maintenue dans la descendance de ces parents.

Message L'effet de la sélection dépend de la part due à la variance génétique additive et non de la variance génétique en général. Il en résulte que c'est l'héritabilité au sens étroit, h^2, et non l'héritabilité au sens large, H^2, qui permet de prédire la réponse à la sélection.

Ce que nous avons décrit comme variance due à la «dominance» est en fait plus compliqué. Il s'agit de toute la variation génétique qui ne peut être expliquée par l'effet moyen de la substitution de *A* par *a*. Si plus d'un locus affecte le caractère, toutes les interactions épistatiques apparaîtront comme une variance non liée à l'effet moyen de substitutions d'allèles au locus *A*. En principe, il est possible de séparer **la variance due aux interactions** (s_i^2) de la variance due à la dominance s_d^2. En pratique, cependant, ceci ne

BCU LAUSANNE / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

peut être fait avec ne fût-ce qu'un semblant de précision, de sorte que toute la variance non-additive se réduit à la variance due à la «dominance».

L'estimation des composantes de la variance génétique

Les composantes génétiques de la variance sont estimées à partir de la covariance entre individus apparentés, mais la façon d'obtenir ces estimaions déborde le cadre d'un traité général.

Il y a, cependant, une autre façon d'estimer h^2 qui donne un aperçu de sa vraie signification. Si nous portons en graphique les phénotypes de descendants par rapport aux phénotypes moyens de leurs deux parents (la valeur parentale moyenne), il est possible d'obtenir une relation du type illustré à la figure 27-20. La droite de régression passera par la moyenne de tous les parents et la moyenne de tous les descendants, qui sont égales puisqu'aucun changement ne s'est produit dans la population d'une génération à l'autre. En outre, des parents plus grands ont des enfants plus grands et des parents plus petits ont des enfants plus petits, de telle sorte que la pente de la droite est positive. Mais la pente n'est pas égale à 1 ; des parents très petits ont des enfants légèrement plus grands et de très grands parents ont des enfants légèrement plus petits qu'eux-mêmes. Cette pente moindre que 1 de la droite de régression provient de ce que l'héritabilité est loin d'être parfaite. Si le phénotype était hérité additivement avec une fidélité parfaite, la taille des descendants serait identique à la valeur mi-parentale et la pente de la droite serait égale à 1. Par contre, si les descendants ne présentaient aucune similarité avec leurs parents, tous les parents auraient une descendance de même taille moyenne et la pente de la droite serait égale à 0. Ceci suggère que la pente de la droite de régression rapportant la valeur de la descendance à la valeur mi-parentale constitue une estimation de l'héritabilité additive, et de fait, cette relation est précise.

Le fait que la pente corresponde à l'héritabilité additive nous permet d'utiliser h^2 pour prévoir les effets de la sélection artificielle. Supposons que nous choisissions comme parents de la génération suivante ceux qui sont en moyenne 2 unités de valeur au-dessus de la moyenne générale de la population au sein de laquelle ils ont été choisis. Si $h^2 = 0{,}5$, la descendance sélectionnée suivante se situera 0,5 (2,0) = 1,0 unité au-dessus de la moyenne de la population actuelle, puisque le coefficient de régression prédit quelle augmentation de y sera due à l'augmentation d'une unité de x. Nous pouvons définir l'**écart de sélection** comme l'écart entre les parents sélectionnés et la moyenne générale et la **réponse à la sélection** comme l'écart entre leurs descendants et la génération précédente. Donc

$$\text{réponse à la sélection} = h^2 \times \text{écart de sélection}$$

ou

$$h^2 = \frac{\text{réponse à la selection}}{\text{écart de selection}}$$

La seconde expression nous donne encore un autre moyen d'estimer h^2 : en sélectionnant pendant une génération et en comparant la réponse avec l'écart de sélection. Le plus souvent ceci se fait pendant plusieurs générations et on détermine la réponse moyenne.

Rappelez-vous que toute estimation de h^2, de même que pour H^2, se fonde sur l'affirmation que les corrélations dues au milieu ne sont pas plus grandes entre parents plus proches. En outre, h^2 dans une population et dans une gamme de milieux ne sera pas exactement semblable à h^2 dans une population différente à un

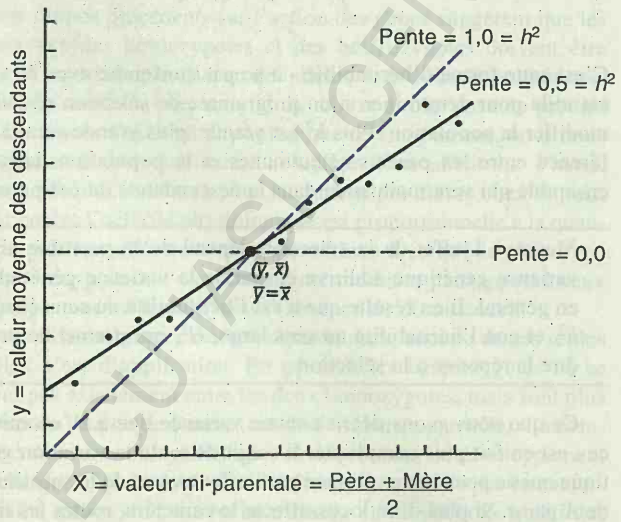


Figure 27-22. Régression (droite en noir) des valeurs mesurées des descendants (y) rapportée à celles des moyennes des deux parents (x) pour un caractère à héritabilité étroite (h^2) de 0,5. La droite bleue illustre la pente de la régression obtenue si le caractère était parfaitement héréditaire.

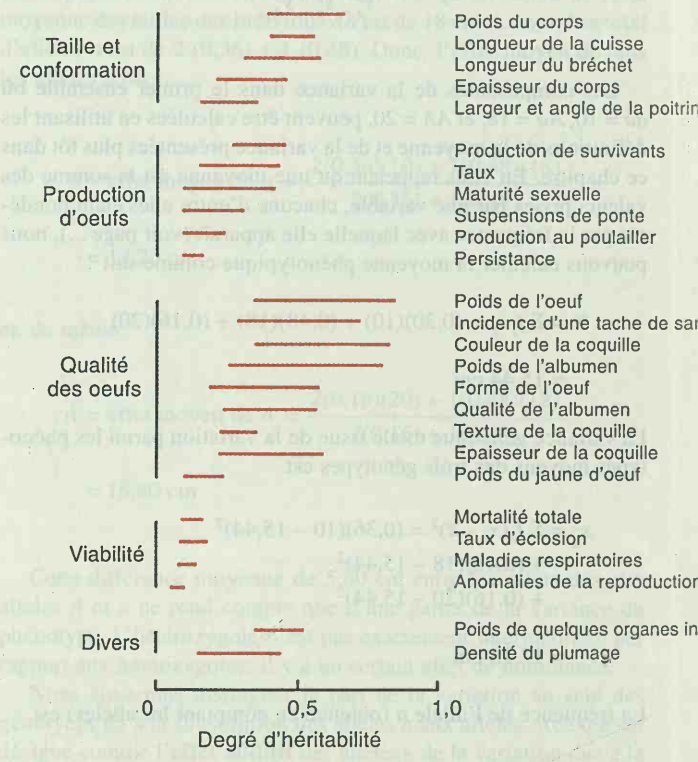


Figure 27-23. Gamme des héritabilités (h^2) pour une série de caractères chez le poulet. (Selon I.M. Lenner et W.J. Libby, *Heredity, Evolution and Society*. Copyright 1976 par W.H. Freeman and Company.)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tableau 27-4. Répartition de la variance phénotypique totale dans le cas de deux caractères dans une population de *Drosophila melanogaster.*

Source de la variation			Pourcentage de variance	
			Nombre de soies abdominales	Taille des ovaires
Variance génétique additive	s^2_a	s^2_g	52	30
Due à la dominance et épistatique	s^2_d		9	40
Due à l'environnement	s^2_e	s^2_c	1	3
Fluctuation due au développement	s^2_n		38	27
Total		s^2_p	100	100

Source : D. Falconer, *Quantitative Genetics*, Longman Group Limited. Copyright 1981.

moment différent. La figure 27-21 donne la gamme d'héritabilité établie pour un grand nombre de caractéristiques chez le poulet. Les très petites zones de variation sont généralement du niveau d'héritabilité zéro, tandis que des différences importantes ont été mentionnées pour la plupart des caractères pour lesquels une héritabilité appréciable a été constatée.

La subdivision de la variance due à l'environnement

La variance due au milieu peut à son tour être subdivisée. En particulier, les fluctuations perturbant le cours du développement sont généralement confondues avec la variance due au milieu, mais lorsqu'un caractère peut être mesuré sur le côté droit et sur le côté gauche d'un organisme ou sur un nombre répété de segments, on peut séparer ces deux effets. Le tableau 27-3 présente la répartition complète de la variation pour deux caractères dans une population de *Drosophila melanogaster* dans des conditions de laboratoire. Chaque caractère comporte une h^2 appréciable ($h^2 = s^2_a/s^2_p$) de sorte que nous pouvons attendre de la sélection qu'elle augmente ou diminue le nombre de poils et la taille des ovaires. En outre, presque toute la variation non-génétique est due aux fluctuations se produisant au cours du développement. Ces valeurs sont cependant une conséquence des conditions relativement contrôlées qui règnent en laboratoire. Dans la nature, s^2_e serait vraisemblablement plus élevée ce qui entraînerait une baisse importante des valeurs relatives de h^2 et de s^2_a. Comme toujours, de telles études de variation ne s'appliquent qu'à une population particulière dans une gamme donnée de milieux.

De l'utilisation de h^2 en élevage et en amélioration

Quoique h^2 ne s'applique qu'à une population particulière et une gamme donnée de milieux, son importance pratique pour l'éleveur est grande (Figure 27-22). Un généticien de volailles désireux d' augmenter le taux de croissance, ne se sent pas concerné par la variance génétique de toutes les basses-cours possibles distribuées dans tous les milieux possibles. Pour une population donnée dans des conditions de milieu qui reflètent celles utilisées actuellement en élevage, la question se résume à savoir si un schéma de sélection peut être conçu afin d'augmenter la vitesse de croissance et si oui, dans quelle mesure? Si un groupe présente une variance génétique élevée et un autre une variance très faible, l'éleveur choisira la première pour sa sélection. Si l'héritabilité du groupe choisi est très élevée, la moyenne de la population répondra rapidement à la pression de sélection imposée, puisque la majeure partie de la supériorité des parents choisis se traduira dans la descendance.

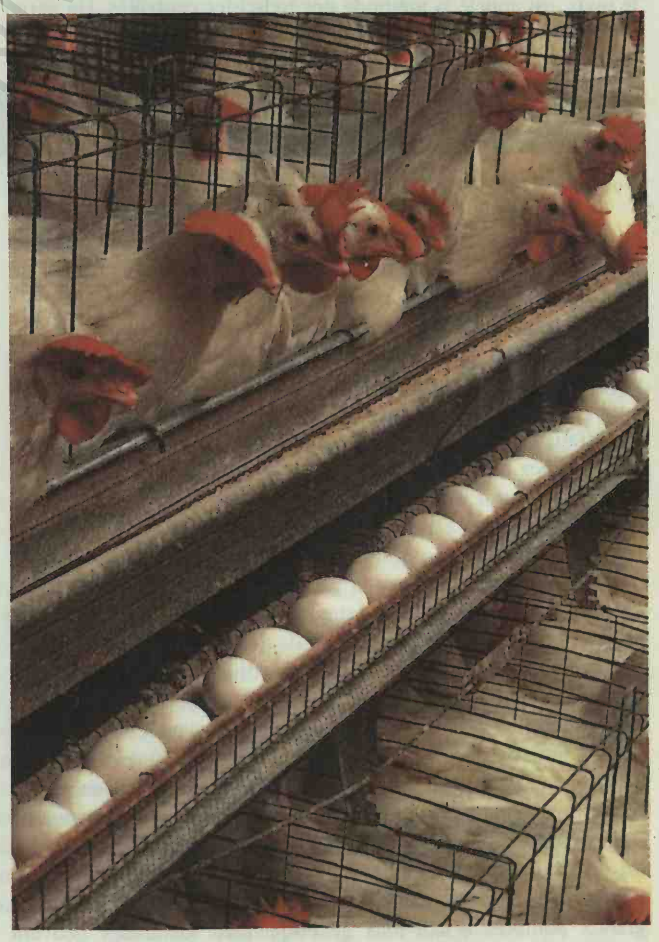


Figure 27-24. Les théories de la génétique quantitative ont été largement appliquées à l'amélioration des volailles (Larry Lefever/Grant Heilman Photography, Inc.)

SUNY AT BUFFALO UNIVERSITY LIBRARY

Plus h^2 est élevée, plus la corrélation parent-enfant le sera aussi. Si, par contre, h^2 est faible, une petite fraction seulement de l'augmentation du taux de croissance des parents sélectionnés se retrouvera dans la génération suivante.

Si h^2 est très faible, un schéma alternatif de sélection ou d'élevage doit être mis en place. Dans ce cas, H^2 peut être utile au sélectionneur, de concert avec h^2. Supposons que H^2 et h^2 soient toutes deux faibles. Cela implique que l'importance de la variance due au milieu est grande par rapport à la variance génétique. Quels moyens avons-nous pour diminuer s_e^2 ? Une méthode consiste à modifier les conditions d'élevage de telle sorte que la variance due au milieu décroisse. Une autre fait usage de la **sélection par famille**. Plutôt que de choisir les meilleurs individus, le sélectionneur produit à partir de divers couples plusieurs descendances et l'*accouplement* se décide sur base de la performance moyenne des descendances. En établissant une moyenne à partir des descendances, les fluctuations incontrôlées dues au milieu ou au développement sont éliminées et une meilleure estimation de la différence génotypique entre couples peut être établie et permet donc de choisir les meilleurs partenaires comme parents de la génération suivante.

Si, par contre, h^2 est faible mais H^2 élevée, cela signifie que le rôle de la variance due au milieu est minime. La faible h^2 est le résultat d'une faible variance génétique additive par rapport à la variance due à la dominance et aux interactions. Une telle situation conduit à faire appel à des schémas de sélection particuliers basé sur la variance non-additive. Un tel schéma, largement utilisé chez le maïs, est appelé la **méthode des hybrides contrôlés**. Un grand nombre de lignées pures sont produites par autofécondation. Elles sont ensuite croisées entre elles dans toutes les combinaisons possibles (si cela se justifie économiquement) et l'on choisit le croisement fournissant le meilleur hybride. De nouvelles lignées pures sont produites à partir de cet hybride supérieur et des croisements sont à nouveau réalisés afin de déceler au cours de ce second cycle le meilleur hybride. Ce schéma sélectionne en fait les effets de dominance, parce qu'il se base sur les meilleurs hétérozygotes; il a été la raison des progrès génétiques marquants sur le rendement de maïs hybride en Amérique du Nord depuis 1930. Le rendement chez le maïs ne semble pas dépendre en majeure partie de la variance génétique non-additive, de telle sorte que l'on peut débattre si cette technique a finalement permis d'obtenir des variétés plus productives que celles qui auraient résulté d'années de sélection simplement basée sur la variance additive.

La méthode des hybrides a aussi été introduite dans la sélection de nombreuses espèces d'animaux et de plantes. Les tomates et les poulets ne comportent pratiquement plus à l'heure actuelle que des variétés hybrides. Des tentatives de sélection de blés hybrides sont aussi en cours, mais jusqu'à présent, les performances de ces hybrides ne sont pas significativement meilleures que celles des variétés non-hybrides utilisées actuellement.

Message La distinction entre la variance génétique et la variation due au milieu nous livre des données importantes sur le mode d'action des gènes, qui sont utilisées en sélection végétale et animale.

RÉSUMÉ

De nombreux caractères phénotypiques - sinon la plupart - observés chez les organismes varient d'une manière continue. Dans la majorité des cas, la variation du caractère est contrôlée par plus d'un locus. Chacun de ces loci peut contribuer d'une manière égale à la réalisation d'un phénotype donné, mais plus vraisemblablement ils y participent de manière inégale. La mesure de ces phénotypes et l'identification de la contribution d'allèles spécifiques à la distribution doivent être menées dans ces cas sur une base statistique. Certaines de ces variations du phénotype (comme la taille chez certaines plantes) peuvent présenter une distribution normale autour d'une valeur moyenne ; d'autres (comme le poids des semences chez certaines plantes) se caractérisent par une distribution biaisée par rapport à une valeur moyenne.

Pour d'autres caractères, la variation d'un phénotype peut être corrélée à la variation d'un autre et un coefficient de corrélation entre ces deux variables peut être calculé.

Un caractère est dit quantitatif, si les différences phénotypiques moyennes entre génotypes sont faibles par rapport à la variation existant entre les individus au sein d'un génotype. Cette situation se rencontre même pour des caractères qui sont influencés par des allèles à un seul locus. La variété des environnements se reflète biologiquement dans une variété de phénotypes. La transformation d'une variété de conditions de milieu en une variété de phénotypes est déterminée par la norme de réaction. Ces normes de réaction peuvent être établies dans le cas d'organismes chez lesquels de grands nombres d'individus génétiquement identiques peuvent être obtenus.

L'usage de chromosomes marqués génétiquement permet d'établir les contributions relatives des différents chromosomes à la variation d'un caractère quantitatif, à reconnaître les effets dus à la dominance et à l'épistasie de chromosomes entiers, et dans certains cas, de cartographier les gènes ségrégeant pour l'un de ces caractères.

Des caractères sont dits familiaux si les membres d'une même famille les partagent, quelle qu'en soit la raison. Les caractères ne sont cependant héritables que si leur similitude provient de génotypes communs. Chez des organismes expérimentaux, les similitudes dues au milieu peuvent se distinguer des similitudes d'ordre génétique, ou héritabilité. Chez l'être humain cependant, l'héritabilité des caractères est très difficile à démontrer. Les études sur les normes de réaction ne montrent que de faibles différences entre génotypes et ces différences ne se maintiennent pas dans une large gamme de milieux. Des génotypes "supérieurs" chez des animaux domestiques ou des plantes cultivées peuvent très bien n'être supérieurs que dans un environnement donné. De même, si l'on parvenait à démontrer qu'une variation génétique était présente chez l'homme pour des caractères mentaux et émotionnels, il est peu probable que cette variation favoriserait un génotype plutôt qu'un autre si elle se présente dans une gamme de milieux différents.

Les tentatives visant à quantifier l'influence des gènes sur un caractère donné ont conduit au concept d'héritabilité au sens large (H^2). En général, l'héritabilité d'un caractère diffère dans chaque population et dans chaque série de milieux et son extrapolation d'une population à une autre ou d'une gamme de milieux à une

autre n'est pas possible. En raison du fait que H^2 ne caractérise que des populations particulières dans un milieu particulier, sa valeur de prédiction est faussée à la base. L'héritabilité au sens étroit, h^2, mesure, elle, la part de la variation phénotypique due à la substitution d'un allèle par un autre. Cette valeur, si elle est élevée, permet de prédire le succès d'une sélection pour un caractère. Si, par contre, h^2 est faible, des modes particuliers de sélection doivent être mis en jeu.

Diagramme conceptuel.

Faites un schéma associant autant que possible les termes suivants. Ceux-ci ne sont pas présentés dans un ordre donné.

variation qualitative / polygènes / loi de Mendel / norme de réaction / milieu / héritabilité / variance / réponse à la sélection / variance additive / QTL.

PROBLÈME DE SYNTHÈSE

Chez certaines espèces d'oiseaux chanteurs, des populations répandues dans différentes régions chantent le chant de l'espèce sous forme de «dialectes locaux» variés. Certains y voient le résultat de différences génétiques existant entre ces populations, tandis que d'autres croient que ces différences proviennent d'idiosyncrasies purement individuelles chez les fondateurs de ces populations, qui ensuite sont transmises de génération en génération par apprentissage. Nous vous demandons d'élaborer les grandes lignes d'un programme expérimental tendant à déterminer l'importance des facteurs génétiques et non-génétiques et de leur interaction dans la variation des dialectes. Dans le cas d'une différence génétique, quelles expériences devraient être menées permettant de décrire le système génétique en cause, en y incluant le nombre de gènes en ségrégation, leurs relations de linkage et leurs effets phénotypiques additifs et non-additifs ?

Solution

Cet exemple a été choisi parce qu'il illustre bien les difficultés expérimentales considérables qui se posent lorsque nous essayons de vérifier les proclamations attribuant des différences de caractère quantitatifs à une base génétique. Etre capable de dire quelque chose au sujet des rôles respectifs du gène et du milieu exige, au minimum, que les organismes en question puissent se développer à partir d'oeufs fécondés dans le milieu contrôlé du laboratoire. Cette exigeance à elle seule élimine un grand nombre d'espèces comme objet d'études. Etablir en détail le rôle des génotypes à l'origine de la variation du caractère, demande, en outre, que les résultats de croisements entre parents de phénotype connu et un ascendant connu puissent être observés et que la descendance de certains de ces croisements puisse, à son tour, être croisée à d'autres individus de phénotype et ascendance connus. Très peu d'animaux satisfont à de telles exigences, bien qu'il soit relativement plus facile de réaliser des croisements contrôlés chez les plantes. Nous présumerons que l'espèce d'oiseau chanteur en cause peut effectivement être élevé et croisé en captivité, ce qui est déjà un sérieux postulat.

a. Pour déterminer si les différences phénotypiques observées entre dialectes se fondent sur une quelconque différence d'ordre génétique, nous devons élever des oiseaux appartenant à chaque population, à partir de l'oeuf, en l'absence de tout chant provenant de leurs propres parents et en présence de combinaisons multiples d'environnements sonores dus à d'autres populations. Ceci se fait en élevant des oiseaux à partir de l'oeuf :

(1) en condition d'isolement
(2) entourés d'une couvée ne comportant que les oiseaux appartenant à la même population
(3) entourés d'une couvée comportant des oiseaux venant d'autres populations
(4) en présence d'adultes chantants provenant d'autres populations
(5) en présence d'adultes chantants provenant de leur propre population (en tant que contrôle des conditions d'élevage).

S'il n'y a pas de différences génotypiques et que toutes les différences dialectales sont en fait apprises, les oiseaux de groupe 5 chanteront le dialecte de leur population et ceux du groupe 4 chanteront un dialecte étranger. Les groupes 1, 2 et 3 pourraient ne pas chanter du tout; ou ils pourraient chanter un chant «généraliste» ne correspondant à aucun des dialectes; ou ils pourraient tous chanter le même dialecte -ce dialecte représentant dès lors le programme «intrinsèque» non-modifié par apprentissage.

Si les différences de dialecte sont totalement déterminées par des différences génétiques, les oiseaux des groupes 4 et 5 chanteront le même dialecte, celui de leurs parents. Les oiseaux des groupes 1, 2 et 3, s'ils chantent, chanteront le dialecte de leur population parentale, indépendamment des autres oiseaux présents dans leur groupe. En outre, nous avons la possibilité qu'à la fois des différences génétiques et apprises influencent le caractère en cause. Par exemple, dés oiseaux du groupe 4 pourraient émettre un chant reprenant des élements des deux populations. Notez que si les oiseaux du groupe contrôle 5 ne chantent pas leur dialecte normal, le reste des résultats devient ininterprétable, puisque les conditions d'élevage artificiel interférent avec le programmme normal du développement.

b. Si les résultats des premières expériences témoignent d'une certain héritabilité au sens large, l'analyse peut se pour-

suivre. Ceci exige une population ségrégant génétiquement, obtenue à partir d'un croisement entre deux populations de dialectes, disons, I et II. Un croisement entre individus mâles de la population I et individus femelles de la population II ainsi que le croisement réciproque nous donneront une estimation du degré moyen de dominance des gènes influençant le caractère et de la possibilité d'une liaison au sexe. (Rappelez-vous que chez les oiseaux le sexe femelle est hétérogamétique). La descendance de ce croisement et tous les croisements en découlant doivent être élevés dans des conditions qui excluent la confusion entre la part génétique et la part d'apprentissage des différences, comme montré dans les expériences au point a. Si les effets d'apprentissage ne peuvent être distingués, l'analyse génétique ultérieure est impossible.

c. La localisation des gènes influençant les différences dialectales demanderont un grand nombre de marqueurs génétiques en ségrégation, tels que des mutants morphologiques ou variants moléculaires sous la forme de polymorphisme pour sites de restriction. Les familles ségrégeant pour des différe de caractères quantitatifs seraient examinées pour déceler de ségrégations entre les loci de l'un ou l'autre des marqueurs le caractère quantitatif. Ceux-ci seraient des candidats pou de loci liés aux loci du caractère quantitatif. Des croisem supplémentaires entre individus avec et sans marqueurs mut et l'estimation des valeurs du caractère quantitatif au sein individus F_2, établiraient la validité d'une liaison entre lo marqueur et du trait quantitatif. En pratique, il est très peu semblable que des expériences de ce type puissent être me chez une espèce d'oiseaux chanteurs en raison du temps e efforts requis pour établir des lignées porteuses d'un g nombre de gènes marqueurs différents et de polymorphi moléculaires.

PROBLÈMES RÉSOLUS

1. Deux lignées pures de haricot sont croisées entre elles. Dans la F_1, la variance du poids des fèves mesurée est 1,5. La F_1 est autofécondée et dans la F_2, la variance du poids des fèves est de 6,1. Estimez l'héritabilité au sens large du poids des fèves dans cette expérience.

Solution

Le point clef ici est de reconnaître que toute la variance des individus F_1 doit être attribuée au milieu puisque tous les individus doivent être de même génotype. Deuxièmement, la variance en F_2 doit être une combinaison de composantes dues au milieu et de composantes génétiques, puisque tous les gènes hétérozygotes en F_1 ségrègent en F_2 pour donner une gamme de génotypes différents en ce qui concerne le poids des fèves. D'où l'estimation

$$s_e^2 = 1,5$$

$$s_e^2 + s_g^2 = 6,1$$

Donc

$$s_g^2 = 6,1 - 1,5 = 4,6$$

et l'héritabilité au sens large est

$$H2 = \frac{4,6}{6,1} = 0,75\ (75\%)$$

2. Dans une population expérimentale de *Tribolium* (coléop de la farine), la longueur du corps présente une distribution c nue autour d'une moyenne de 6 mm. Un ensemble de mâles femelles dont la longueur est de 9 mm sont isolés et croisés eux. La longueur moyenne de leur descendance est de 7,2 m partir de ces données, calculez l'héritabilité au sens étroit longueur du corps dans cette population.

Solution

L'écart de sélection représente 9 – 6 = 3 mm, et la réponse sélection est de 7,2 – 6 = 1,2 mm. Nous en déduisons que l'hé bilité au sens étroit est

$$h^2 = 1,2 / 3 = 0,4\ (40\%).$$

PROBLÈMES

1. Etablissez ce qui distingue variation continue et discontinue dans une population. Donnez quelques exemples dans chaque cas.

2. Dans un vaste troupeau de bestiaux, trois caractères différents dont la distribution est continue sont mesurés et leurs variances calculées sont représentées dans le tableau suivant:

Variance	Caractères		
	longueur du jarret	longueur du collier	contenu graiss
variance phénotypique	310,2	730,4	106
variance due au milieu	248,1	292,2	53
variance génétique additive	46,5	73,0	42
variance génétique due à la dominance	15,6	365,2	10

a. Calculez l'héritabilité au sens large et étroit pour chacun des caractères.

b. Dans la population étudiée, quel caractère répondrait le mieux à la sélection ? Pourquoi ?

c. Un projet est entrepris pour diminuer le contenu moyen en graisse des animaux du troupeau. Le contenu moyen en graisses est de 10,5 pour cent. Des animaux à 6,5 pour cent de contenu en graisses sont choisis comme parents et croisés entre eux pour donner lieu à la génération suivante. Que peut-on attendre du contenu moyen en graisse de ces descendants ?

3. Supposons que deux triples hétérozygotes AaBbCc sont croisés entre eux et que les trois loci se répartissent sur des chromosomes différents.

a. Quelles proportions de la descendance seront-elles homozygotes pour respectivement un, deux ou trois loci ?

b. Quelles proportions de la descendance comporteront respec-tivement 0, 1, 2, 3, 4, 5 et 6 allèles (représentés par une lettre majuscule) ?

4. Au problème 3, supposons que l'effet phénotypique moyen des trois génotypes au locus *A* soit *AA* = 4, *Aa* = 3, *aa* = 1 et que des effets similaires existent pour les loci *B* et *C*. En outre, supposons que les effets de ces loci soient additifs. Calculez et portez en graphique la distribution des phénotypes dans la population (en faisant l'hypothèse de l'absence de variance due au milieu).

5. Supposons que dans le problème 4, un seuil existe dans l'expression du caractère de sorte que si la valeur phénotypique est supérieure à 9, la drosophile possède trois soies; si cette valeur est entre 5 et 9, deux soies, et pour 4 ou moins, chaque mouche porte une soie. Envisagez le résultat des croisements au sein de chaque classe de nombre de soies et entre elles. Sur la base du résultat, pourriez-vous déduire la situation génétique sous-jacente ?

6. Supposez que la forme générale de distribution d'un caractère représentant un génotype donné est

$$f = 1 - \frac{(x - \bar{x})2}{s_e^2}$$

pour toutes les valeurs de x pour lesquelles f est positif.

a. Portez en graphique, à la même échelle, les distributions des trois génotypes caractérisés par les moyennes et variances dues au milieu suivantes :

Génotype	$\bar{x}$	s^2_e	gamme approximativede phénotypes
1	0,20	0,3	x=0,03 à x=0,37
2	0,22	0,1	x=0,12 à x=0,24
3	0,24	0,2	x=0,10 à x= 0,38

b. Portez en graphique la distribution phénotypique caractérisant une situation où les trois génotypes seraient représentés à fréquence égale dans la population. Pouvez-vous déceler des modes distincts ? Dans ce cas, quels sont-ils ?

7. Le tableau suivant donne la distribution du nombre de soies chez *Drosophila*

Nombre de soies	Nombre d'individus
1	1
2	4
3	7
4	31
5	56
6	17
7	4

Calculez la moyenne, la variance et l'écart-type de cette distribution.

8. Les séries suivantes de données hypothétiques représentent des observations conjointes portant sur deux variables (x, y). Portez ces séries de données sur un diagramme de dispersion. Sur la base de la répartition des points, devinez intuitivement le coefficient de corrélation existant entre x et y. Ensuite, calculez le coefficient de corrélation pour chaque série de couples de données et comparez cette valeur à celle de votre estimation.

a. (1, 1); (2, 2); (3, 3); (4, 4); (5, 5); (6, 6).

b. (1, 2); (2, 1); (3, 4); (4, 3); (5, 6); (6, 5).

c. (1, 3); (2, 1); (3, 2); (4, 6); (5, 4); (6, 5).

d. (1, 5); (2, 3); (3, 1); (4, 6); (5, 4); (6, 2).

9. Un traité concernant l'héritabilité du QI affirme les trois points suivants. Discutez la validité de chaque point et ses implications sur la compréhension de h^2 et H^2 par les auteurs.

a. «La question intéressante est donc ...Dans quelle mesure est-ce héréditaire ? La réponse (0,01) conduit à une application théorique et pratique très différente de la réponse (0.99).» (Les auteurs discutent de H^2).

b. «.Comme règle empirique, lorsque des problèmes d'éducation sont en cause, H^2 est habituellement le coefficient le plus indiqué, et lorsque des problèmes d'eugénique et de dysgénique (reproduction d'individus sélectionnés) sont discutés, h^2 est généralement ce qui convient.»

c. Le point de savoir si les formes variables de compétence proviennent de différences au niveau des gènes ... n'est pas pertinent comme base de mesures discriminatoires lors de l'embauche de personnel. Il pourrait par contre se justifier lorsqu'il s'agit de décider ce qui, à long terme, pourrait être fait pour modifier la situation existante.»

(Ce problème est extrait de *Races Differences in Intelligence* de J.C. Lochlin, G. Lindzey, et J.N. Spuhler, Copyright © 1975, W.H. Freeman and Company.)

10. En utilisant les concepts de norme de réaction, de distribution des milieux, de distribution génotypique et phénotypique, efforcez-vous de reformuler le point de vue suivant de façon plus

BCU LAUSANNE CENTRALE UNIVERSITY LIBRARY

exacte: «80 pour cent de la différence entre les performances QI de deux groupes est de nature génétique» « 80 pour cent de la différence entre les performances QI de deux groupes est de nature génétique». Quelle signification attacher à l' «héritabilité d'une différence» entre deux groupes ?

11. Décrivez un protocole expérimental pour une étude portant sur des individus apparentés en vue d'estimer l'héritabilité au sens large de l'alcoolisme. Rappelez-vous que vous devez donner tout d'abord une définition du caractère lui-même basée sur une observation adéquate.

12. Une lignée sélectionnée pour un grand nombre de soies chez *Drosophila* présente une moyenne de 25 soies sternopleurales, alors qu'une lignée sélectionnée pour un faible nombre de soies n'en présente que 2 en moyenne. Des stocks de marqueurs concernant les deux grands autosomes II et III sont utilisés pour créer des stocks à composition variée de chromosomes à partir des lignées à nombre de soies grand (g) ou petit (p). Le nombre moyen de soies pour chaque combinaison de chromosomes est le suivant :

$\frac{g}{g}\frac{g}{g}$ 25,1	$\frac{g}{p}\frac{g}{g}$ 22,2	$\frac{p}{p}\frac{g}{g}$ 19,0
$\frac{g}{g}\frac{g}{p}$ 23,0	$\frac{g}{p}\frac{g}{p}$ 19,9	$\frac{p}{p}\frac{g}{p}$ 14,7
$\frac{g}{g}\frac{p}{p}$ 11,8	$\frac{g}{p}\frac{p}{p}$ 9,1	$\frac{p}{p}\frac{p}{p}$ 2,3

Quelles conclusions pouvez-vous tirer concernant la distribution de facteurs génétiques et leur action à partir de ces données ?

13. Supposons que le nombre de facettes de l'oeil soit mesuré dans une population de *Drosophila* sous différentes conditions de température. Supposons en outre qu'il soit possible d'estimer la variance génétique totale s^2_g de même que la distribution phénotypique. Enfin, supposons aussi que la population ne comporte que deux génotypes. Représentez des paires de normes de réaction qui aboutiraient aux résultats suivants :

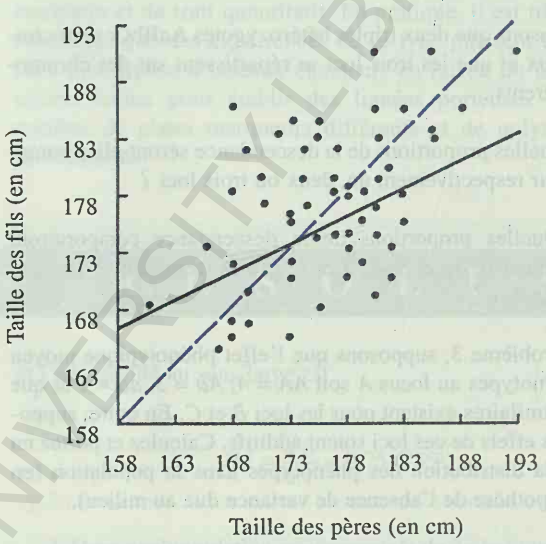
a. Une augmentation de la température moyenne diminue la variance phénotypique.

b. Une augmentation de la température moyenne augmente H^2.

c. Une augmentation de la température moyenne accroît s^2_g mais diminue H^2.

d. Une augmentation de la variance à la température transforme une distribution phénotypique unimodale en une distribution bimodale (une seule norme de réaction suffit dans ce dernier cas).

14. Francis Galton compara les tailles d'étudiants à celles de leurs pères, avec comme résultats ceux montrés dans le graphique suivant:



La taille moyenne de tous les pères est la même que la taille moyenne de tous les fils, mais les classes de taille individuelles ne sont pas semblables d'une génération à l'autre. Les pères aux tailles les plus élevées ont des fils à taille légèrement plus petite, alors que le pères très petits ont des fils quelque peu plus grands. La meilleure droite qui peut être tracée par les points du diagramme de dispersion a une pente d'environ 0,67 (droite pleine) plutôt que de 1,00 (droite formée de tirets). Galton utilisa le terme de régression pour désigner cette tendance des phénotypes des fils à être plus proches de la moyenne de la population que des phénotypes de leurs pères.

a. Proposez une explication pour cette régression.

b. Quels sont ici les relations entre régression et héritabilité ?

(D'après W.F. Bodmer et L.L. Cavalli-Sforza, *Genetics, Evolution, and Man.* Copyright © 1976 by W.H. Freeman and Company.

BCU LAUSANNE / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bibliographie

L'étudiant désireux d'approfondir ses connaissances en génétique commencera dès que possible à lire les articles de recherche originaux publiés dans les revues scientifiques. Parmi les périodiques importants, on retiendra particulièrement Cell, Current Genetics, Evolution, Gene, Genetic Research, Genetics, Heredity, Human Genetics, Journal of Medical Genetics, Journal of Molecular Biology, Molecular and General Genetics, Mutation Research, Nature, Plasmid, Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America et Science. D'utiles articles de synthèse et de revue sont régulièrement publiés dans Annual Review of Genetics, Advances in Genetics et Trends in Genetics.

Quelques références particulièrement utiles, pour la plupart des articles généraux, sont classées ci-dessous dans l'ordre des chapitres qu'elles concernent.

Chapitre 1

Bocquet, C.; Génermont, J.; Lamotte, M. Les Problèmes de l'Espèce dans le Règne Animal. Paris: Soc. Zool. de France; 1976.

Clausen, J.; Keck, D.D.; Hiesey, W.W. Experimental Studies on the Nature of Species, Vol. 1 : The Effect of Varied Environments on Western North American Plants. Carnegie Institute of Washington: Publ. N° 520,1-452; 1940. Cette publication constitue, avec la suivante par les même auteurs, une étude classique des normes de réaction des plantes des populations normales.

Clausen, J.; Keck, D.D.; Hiesey, W.W. Experimental Studies on the Nature of Species, Vol. 3 : Environmental Responses of Climatic Races of Achillea. Carnegie Institute of Washington: Publ. n° 581, 1 à 129; 1958.

Mayr, E. La Biologie de l'Evolution. Paris: Hermann; 1981. Un bon texte général utile à consulter entre autres pour la définition du concept d'espèce.

Milunsky, A.; Annas, G.J., eds. Genetics and the Law. New York: Plenum Press; 1975. Un exposé intéressant des implications de la génétique pour la vie des individus.

Moore, J A. Science As a Way of Knowing—Genetics. American Zoologist 25: 1–165. 1985. Un bref ouvrage d'une excellente série consacrée aux méthodologies scientifiques.

Schmalhausen, I.I. Factors of Evolution : The Theory of Stabilizing Selection. Philadelphia: Blakiston; 1949. Une discussion très générale des relations du génotype et de l'environnement dans l'élaboration de la variation phénotypique.

Chapitre 2

Carlson, E. A. 1966. The Gene: A Critical History. Philadelphia: W. B. Saunders. Une histoire de la génétique facile à lire.

Grant, V. 1975. Genetics of Flowering Plants. New York: Columbia University Press. Un des rares textes sur ce sujet.

Harpstead, D. 1971. «High-Lysine Corn». Scientific American (August). L'obtention de lignées présentant des quantités accrues d'acides aminés normalement limitants.

Hutt, F. B. 1964. Animal Genetics. New York: Ronald Press. Un texte classique contenant de nombreux exemples intéressants.

Jennings, P. R. 1976. «The Amplification of Agricultural Production». Scientific American (September). Une discussion sur la génétique et la révolution verte.

McKusick, V. A., et al. 1990. Mendelian Inheritance in Man. 9th ed. Baltimore and London: John Hopkins Press. La «bible» de la génétique médicale; rassemble en 2000 pages tout ce que l'on sait sur les maladies humaines héréditaires, qu'elles soient autosomiques ou liées à X.

Mange, A. P., and E. J. Mange. 1990. Genetics: Human Aspects, 2d ed. Sunderland Mass.: Sinauer. Un texte utile et bien à jour pouvant servir de cours sur la génétique humaine.

Olby, R. C. 1966. Origins of Mendelism. London: Constable. Un compte-rendu plaisant des travaux de Mendel et du climat intellectuel à l'époque.

Rousseau, F., et al. 1994. «Mutations in the Gene Encoding Fibroblast Growth Factor Receptor in Achondroplasia». Nature 371, 253-254. Un court article rapportant l'identification moléculaire de l'allèle anormal responsable de l'achondroplasie.

Stern, C., and E. R. Sherwood. 1966. The Origin of Genetics: A Mendel Source Book. New York: W. H. Freeman and Co. Un choix restreint parmi les premiers articles importants, y compris ceux de Mendel lui-même et sa correspondance.

Sturtevant, A. H. 1965. A History of Genetics. New York: Harper and Row. Un autre texte historique utile.

Thompson, J. S., and M. W. Thompson. 1980. Genetics in Medecine. Philadelphia: Saunders. L'un des livres classiques sur la génétique médicale. Concis et facile à lire.

UCLA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Todd, N. B. 1977. «Cats and Commerce». Scientific American (November).Comprend des données sur la génétique de la pigmentation de la fourrure chez le chat domestique et montre comment cette information peut être utilisée pour étudier les migrations du chat au cours de l'histoire.

Vogel, F., and A. G. Motulsky. 1986. Human Genetics: Problems and Approaches, 2d ed. New York: Springer-Verlag. Un autre ouvrage de référence déjà classique.

Chapitre 3

Crow, J.F. *Genetic Notes*, 8è éd. New York : Macmillan; 1983. Un aperçu concis de la génetique, de Mendel à la génétique des populations.

McIntosh, J.R.; McDonald, K.L. Le fuseau mitotique. *Scientific American*. octobre 1988.

McLaren, A. Sex Determination in Mammals. *Trends in Genetics* : 4 : 153-157.

McLeish, J.; Snoad, B. *Looking at Chromosomes*. New York: Macmillan; 1958. Un petit ouvrage classique comprenant de superbes photos de méioses et de mitoses.

Rick, C.M. La tomate. P*our la Science:* octobre 1978. Décrit les gènes et les chromosomes de la tomate et l'importance de certains d'entre eux pour la culture et l'amélioration de l'espèce.

Stern, C. *Principles of Human Genetics*, 3e éd. New York: W.H. Freeman and Co; 1973. Un texte classique illustrant par de nombreux exemples le déterminisme génétique des traits humains.

von Wettstein, D. et coll. The Synaptonemal Complex in Genetic Segregation. A*nnual Review of Genetics*. 18:331-414; 1984. Une revue récente de ce qu'on sait de la structure et de la fonction du complexe.

Chapitre 4

Bodmer, W.F.; Cavalli-Sforza L.L. *Genetics, Evoltion and Man*. New York: W.H. Freeman and Co; 1976. Un livre très agréable à lire et bien illustré, comprenant une explication très claire de la génétique des HLA.

Griffiths, A.J.F.; Ganders F.R. *Wildflower Genetics*. Vancouver: Flight Press; 1984. Un guide "de terrain" de la variation chez les plantes au sein de populations naturelles et de sa base génétique. Il présente des exemples se rapportant à ce chapitre.

Griffiths, A.J.F. et J. McPherson. 1989. *One Hundred + Principles of Genetics*. New York : W.H. Freeman and Co. Un résumé des concepts-clés de la génétique, utile pour une révision rapide de l'ensemble du sujet.

Hutt, W.B. 1979. *Genetics for Dog Breeders*. New York : W.H. Freeman and Co. Un livre court mettant la génétique à la portée des propriétaires et éleveurs de chiens.

Searle, W.K. *Comparative Genetics of Coast Color in Mammals*. New-York: Academic Press; 1968. Un traitement classique de ce sujet, illustré de nombreux exemples se rapportant à plusieurs chapitres du présent ouvrage.

Silvers W.K. *The Coat Colors of Mice*. New York: Springer Verlag; 1979. Un manuel classique sur ce sujet, comportant de nombreux exemples d'interactions entre gènes.

Wright, M., and S. Walters, eds. 1981. *The Book of the Cat*. New York : Summit Books. Un livre fascinant incluant un excellent chapitre traitant les interactions entre gènes qui déterminent la couleur du pelage chez les chats domestiques.

Chapitre 5

O'Brien, S.J., ed. *Genetic Maps*. Cold Spring harbor Press; 1984. Une compilation récente des cartes génétiques détaillées de 80 organismes.

Peters, J.A., ed. *Classic Papers in Genetic*. N.J.: Prentice-Hall: Englewood Cliffs; 1959. Un recueil d'articles qui ont fait date dans l'histoire de la génétique.

White, R. et al. *Construction of Linkage Maps with DNA Markers for Human Chromosomes. Nature*. 313:101-104; 1985. Les techniques décrites dans ce chapitre sont appliquées à des marqueurs sur l'ADN humain.

Chapitre 6

Fincham, J.R.S.; Day, P.R.; Radford, A. *Fungal Genetics*, 3e éd. Londres: Blackwell; 1979. Un gros ouvrage technique de référence. Excellent pour l'analyse de tétrades.

Kemp, R. C*ell Division and Heredity*. London: Edward Arnold; 1970. Une introduction à la fois claire et succinte à la génétique. Bonne présentation de la fonction cartographique et de l'analyse de tétrades.

Murray, A.W.; Szostak, J.W. Construction of Artificial Chromosomes in Yeast. *Nature*. 305:189-193; 1983. Le premier rapport sur la création de nouveaux chromosomes. Comment la technologie de l'ADN recombinant fut exploitée pour joindre les uns aux autres télomères, centromère, origine de réplication puis fragments d'ADN déterminés. Inclut la cartographie des marqueurs des nouveaux chromosomes par analyse de tétrades.

Puck, T.T.; Kao, F.-T. Somatic Cell Genetics and Its Application to Medicine. *Annual Review of Genetics*. 16:225-272; 1982. Une revue technique mais très lisible.

Ruddle, F.H.; Kucherlapati, R.S. Hybrid Cells and Human Genes. *Scientific American*. Juillet 1974. Un article de vulgarisation sur l'utilisation de l'hybridation cellulaire pour cartographier les gènes humains.

Stahl, F.W. *The Mechanics of Inheritance* , 2e éd. N.J.: Prentice-Hall: Englewood Cliffs; 1969. Une courte introduction à la génétique. Certains aspects sont présentés de façon approfondie et originale.

Chapitre 7

Induced Mutations-A Tool in Plant Research. 1981. Vienna: International Atomic Energy Agency. Un ensemble d'articles par des spécialistes éminents de la génétique appliquée à l'agriculture; illustrant l'emploi de mutations dans l'amélioration des plantes.

Lawrence, C. W. 1971. Cellular Radiobiology. London: Edward Arnold. Un texte de référence concis.

Lindsley, D. L., and E. H. Grell. 1972. Genetic Variations of Drosophila melanogaster. Washington, D.C.: Carnegie Institute of Washington. Un livre de référence pour les chercheurs travaillant avec la drosophile, contenant les milliers de mutations connues chez cet organisme. Fascinant à parcourir pour tous ceux qui s'intéressent à la génétique en général et aux contributions majeures de la recherche sur Drosophila.

Neuffer, M. G., L. Jones, and M. S. Zuber. 1968. The Mutants of Maize. Madison: Crop Science Society of America. Un catalogue en couleur des nombreux (et souvent bizarres) mutants utilisés par les généticiens du maïs.

Schull, W. J., et al. 1981. «Genetic Effect of the Atomic Bombs: A Reappraisal». Science 213: 1220-1227. Un résumé de tous les indicateurs d'effets génétiques potentiels des explosions d'Hiroshima et de Nagasaki, concluant qu'on n'a pas décelé d'ef-

fet statisiquement probant de l'exposition subie par les parents; cependant, pour tous les indicateurs, l'effet observé est en accord avec l'hypothèse que l'exposition a bien causé des altérations génétiques.

de Serres, F. J., and A. Hollaender, eds. 1982. Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection., Vol. 7. New York: Plenum Press. L'un des utiles volumes consacrés à cette importants catégorie de mutagènes qui concerne particulièrement la mutagénèse chez l'Homme.

Chapitres 8 and 9

Dellarco, V. L., P. E. Voytek, and A. Hollaender. 1985. Aneuploidy: Etiology and Mechanisms. New York: Plenum. Un ensemble de résumés sur l'aneuploïdie chez l'Homme et des organismes de laboratoire.

Epstein, C. J., et al. 1983. «Recent Developments in Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases and Birth Defects». Annual Review of Genetics 17: 49-83. Comprend l'amniocentèse.

Feldman, M. G., and E. R. Sears. 1981. «The Wild Gene Resources of Wheat». Scientific American (January). Une analyse générale des génomes du blé et de plantes voisines, y compris l'introduction de nouveaux gènes.

Friedmann, T. 1971. «Prenatal Diagnosis of Genetic Disease». Scientific American (November). Un des premiers articles sur l'amniocentèse et ses usages.

Fuchs, F. 1980. «Genetic Amniocentèses». Scientific American (August).

German, J., ed. 1974. Chromosomes and Cancer. New York: Wiley. Un important ouvrage technique mais accessible et décrivant les relations entre altérations chromosomiques et cancer.

de Grouchy, J., and C. Turleau. 1984. Clinical Atlas of Human Chromosomes. New York: Wiley. Un examen systématique de tous les chromosomes humains et des aberrations qui leurs sont associées.

Hassold, T. J., and P. A. Jacobs. 1984. «Trisomy in Man». Annual Review of Genetics 18: 69-98. Un résumé complet de la trisomie comprenant une discussion des effets de l'âge de la mère.

Hulse, J. H., and D. Spurgeon. 1984. «Triticale». Scientific American (August). Un article consacré à la construction et aux avantages probables de cet amphidiploïde entre le blé et l'orge.

Lawrence, W. J. C. 1968. Plant Breeding. London: Edward Arnold (Studies in Biology, No. 12). Une courte introduction au sujet.

Mangelsdof, P. C. 1986. «The Origins of Corn». Scientific American (August).

Maniatis, T. E., et al. 1980. «The Molecular Genetics of Human Hemoglobins». Annual Review of Genetics 14: 145-178. Un résumé utile, surtout à cette étape du cours ou encore après avoir lu les chapitres de génétique moléculaire.

Patterson, D. 1987. «The Causes of Down Syndrome». Scientific American (August). Pour la Science (Octobre 1987)

Shepherd, J. F. 1982. «The Regeneration of Potato Plants from Protoplasts». Scientific American (May). Revue écrite par l'un des principaux spécialistes dans ce domaine. Pour la Science (Juillet 1982)

Swanson, C. P., T. Mertz, and W. J. Young. 1967. Cytogenetics. Englewood Cliffs, N. J.: Prentice-Hall.

Chapitre 10

Adelberg, E.A. *Papers on Bacterial Genetics*. Boston: Little, Brown; 1966.

Brock, T.D. *The Emergence of Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1990. Un traité complet et détaillé sur les origines de la génétique bactérienne, qui met l'accent sur l'histoire des premiers développements dans ce domaine.

Cunin, R. *Génétique bactérienne*. Paris : Vigot; 1993. Un petit livre qui donne un aperçu du domaine, qui explique la contribution de la génétique bactérienne à l'étude des processus biologiques essentiels et son rôle dans le développement de la biologie moléculaire et de la biotechnologie.

Hayes, W. *The Genetics of Bacteria and Their Viruses* , 2e éd. New York: Wiley; 1968. L'ouvrage classique de référence, écrit par un pionnier de ce domaine.

Lewin, B. *Gene Expression*, Vol. 1 : *Bacterial Genomes*. New York: Wiley; 1977. Une excellente série d'ouvrages qui couvre toutes les sections du présent volume.

Lewin, B. *Gene Expression*, Vol. 3 : *Plasmids and Phages*. New York: Wiley; 1977.

Miller, J.H. *A Short Course in Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. Un manuel de laboratoire qui fournit aussi une brève introduction historique de chaque domaine de la génétique bactérienne.

Stent, G.S.; Calendar R. *Molecular Genetics*, 2e éd. New York: W.H. Freeman and Co; 1978. Un compte rendu extrêmement clair, basé principalement sur des expériences sur les bactéries et les phages, des développements qui ont mené à notre compréhension actuelle du sujet.

Chapitre 11

Dickerson, R.E. Les doubles hélices d'ADN et les informations génétiques. Pour la Science. Février 1984. Un article contenant de très beaux modèles en couleurs de la structure de l'ADN.

Kornberg, A. ; Baker, T. DNA replication. 2ième éd. New York: W.H. Freeman and Co; 1992. Un traitement approfondi du sujet, basé sur les analyses génétique et chimique.

Wang, J.C. Les enzymes qui modifient la topologie de l'ADN. Pour la Science. Septembre 1982. Schématise les différentes formes topologiques de l'ADN.

Watson, J.D. La double hélice. Paris: Lafont; 1984. Un récit agréable et personnel de la découverte de Watson et Crick, ainsi que des drames humains qu'elle a impliqués.

Chapitre 12

Benzer, S. The Fine Structure of the Gene. Scientific American. Janvier 1962. Un article qui présente sous une forme accessible les travaux d'avant-garde de l'auteur.

Dressler, D.; Potter, H. Discovering Enzymes. New York: Scientific American Library; 1991. Un livre merveilleux qui décrit la découverte des enzymes et illustre beaucoup de leurs propriétés dans des figures bien conçues et faciles à lire.

Felsenfeld, G. L'ADN. Pour la Science. Décembre 1985.

Prusiner, S. B. Les maladies provoquées par les prions Pour la Science. Mars 1995. Un article de revue décrivant le phénomène captivant des particules protéiques infectieuses.

Radman, M.; Wagner R. La Réplication de l'ADN: un Mécanisme Haute Fidélité. Pour la Science. Octobre 1988.

Watson, J.D.; Hopkins N.H.; Roberts J.W.; Steitz J.A.; Weiner A.M. La Biologie Moléculaire du Gène. 4e éd. Paris: Inter Editions; 1989. Une superbe présentation du sujet, rédigée dans un style très accessible et remarquablement illustrée.

Yanofsky, C. Gene Structure and Protein Structure. Scientific American. Mai 1967. Cet article décrit au niveau moléculaire la colinéarité des gènes et des protéines.

Chapitre 13

Crick, F.H.C. The Genetic Code. Scientific American. Octobre 1962. Cet article, comme celui qui suit, met à la portée du non-spécialiste les expériences qui ont conduit au déchiffrement du code génétique.

Crick, F.H.C. The Genetic Code : III. Scientific American. Octobre 1966.

Danchin, A. L'Oeuf et la Poule. Paris: Fayard; 1983.

Darnell, J.E. Jr. L'ARN. Pour la Science. Décembre 1985.

Doolittle, R.F. Les Protéines. Pour la Science. Décembre 1985.

Lake, J.A. The Ribosome. Pour la Science. Octobre 1981. Un modèle à trois dimensions du ribosome.

Lane, C. Rabbit Haemoglobin from Frog Eggs. Scientific American. Août 1976. Cet article décrit des expériences qui illustrent l'universalité du système génétique.

Lawn, R.M.; Vehar G.A. Vers un traitement de l'hémophilie. Pour la Science. Mai 1986.

Miller, O.L.The Visualization of Genes in Action. Scientific American. Mars 1973. Une discussion de la microscopie électronique de la transcription et de la traduction.

Moore, P.B. Neutron-Scattering Studies of the Ribosome. Scientific American. Octobre 1976. Un article qui décrit en détail la structure du ribosome.

Nirenberg, M.W. The Genetic Code: II. Scientific American. Mars 1963. Un autre récit des premières expériences de déchiffrement du code.

Radman, M.; Wagner R. La Réplication de l'ADN : un Mécanisme Haute Fidélité. Pour la Science. Octobre. 1988.

Rich, A.; Kine S.H. La Structure tridimensionnelle de l'ARN de transfert. Pour la Science. Mars 1978. Un exposé des preuves expérimentales sur lesquelles reposent les structures décrites dans ce chapitre.

Weinberg, R.A. Les Molécules de la Vie. Pour la Science. Décembre 1985.

Chapitre 14

Britten, R.J.; Kohne D. Repeated Sequences in DNA. Science. 161:529-540; 1968. L'un des résumés des bases théoriques sur lesquelles reposent la discrimination des ADN par la renaturation.

Broda, P. Plasmids. New York: W.K. Freeman and Co; 1979. L'un des rares livres techniques sur le sujet.

Brown, D.D. The Isolation of Genes. Scientific American. Août 1973. Illustre la puissance de la concentration des techniques moléculaires sur un locus unique qui présente des propriétés particulières.

Cohen, S. The Manipulation of Genes. Scientific American. July 1975. Un résumé des techniques de l'ADN recombinant, par l'un des pionniers dans ce domaine.

Fiddes, J.C. The Nucleotide Sequence of a Viral DNA. Scientific American. Décembre 1977. La revue d'un fait marquant : la séquence complète d'un génome viral et une découverte inattendue.

Gilbert, W.; Villa-Komaroff L. Useful Proteins from Recombinant Bacteria. Scientific American. Avril 1980. Une description d'une des méthodes de détermination des séquences de nucléotides couramment utilisées. Discute également les implications de l'application des techniques de l'ADN recombinant.

Itakura, K., et al. Expression in E. coli of a Chemically Synthesized Gene for the Hormone Somatostatin. Science 198; 1056–1063; 1977. Un article technique à lire pour son importance historique. Il marque le début de la biotechnologie - l'utilisation d'ADN manipulé pour modifier les cellules et produire une protéine humaine d'importance médicale.

Khorana, H.G., et al. Studies on Polynucleotides. CIII. Total Synthesis of the Structural Gene for an Alanine Transfer Ribonucleic Acid from Yeast. Journal of Molecular Biology. 72:209-217; 1972. Un article technique classique.

Nathans, D.; Smith H.O. Restriction Endonucleases in the Analysis and Restructuring of DNA Molecules. Annual Review of Biochemistry. 44:273-293; 1975. Une revue technique des enzymes de restriction écrite par deux pionniers dans ce domaine.

Sinsheimer, R.L. Recombinant DNA. Annual Review of Biochemistry. 46: 415–438; 1977. Un article provocateur par un biologiste moléculaire de renom qui s'est montré concerné par les problèmes des dangers potentiels des manipulations de l'ADN.

Varmus, H. Reverse Transcription. Scientific American. September 1987.

Watson, J.D. ; Gilman, M. ; Witkowski, J. ; Zoller, M. ADN Recombinant, 2ième éd. Bruxelles: De Boeck-Weesmael; 1994. Une excellente introduction à la théorie et aux applications des techniques de l'ADN recombinant, avec de nombreuses illustrations.

Chapitre 15

Capecchi, M.R. Targeted Gene Replacements. *Scientific American;* Mars 1994. Un article très apprécié qui décrit la production de mutants nuls de Souris par inactivation ciblée de gènes.

Mertens, T.R. *Human Genetics : Readings on the Implications of Genetic Engineering*. New York : Wiley; 1975. Une collection d'articles de vulgarisation.

Moses, P.B.; Chua, N.H. Light Switches for Plant Genes. *Scientific American;* Avril 1988.

Murray, A.W.; Szostak, J.W. Les chromosomes artificiels. *Pour la Science*; Janvier 1988.

Watson, J.D.; Gilman, M.; Witkowski, J.; Zoller, M. *ADN Recombinant,* 2è éd. Bruxelles : De Boeck-Université; 1994. Un livre très bien écrit sur la technologie de l'ADN recombinant et sur ses applications, avec beaucoup d'illustrations magnifiques.

White, R.; Lalouel, J.M. La cartographie des chromosomes. *Pour la Science*; Avril 1988.

Chapitre 16

Britten, R.J.; Kohne D.E. Repeated Segments of DNA. *Scientific American*. Avril 1970.

Brown, S.W. Heterochromatin. *Science* 151:417-425; 1966. Un bon article de revue sur les observations cytologiques.

Chambon, P. Les gènes en mosaïque. *Pour la Science*. Juillet 1981. Une description de la découverte des introns.

Darnell, J.H.; Lodish, H.; Baltimore, D. Biologie Moléculaire de la Cellule, 2è éd. Bruxelles : DeBoeck-Université. 1993. Un livre très utile qui intègre très bien les concepts génétiques aux processus cellulaires correspondants et qui contient deux chapitres bien documentés sur la structure des chromosomes et les différentes sortes d'ADN répétitif.

Davidson, E.; Britten R. Organization, Transcription and Regulation in the Animal Genome. *Quarterly Review of Biology*. 48:565-613; 1973. L'analyse de la cinétique de renaturation de fragments d'ADN fournit des informations sur la structure des chromosomes.

Dupraw, E.J. *DNA and Chromosomes*. New York: Holt, Rinehart,

Winston; 1970. Un livre très utile sur l'ultrastructure des chromosomes, qui contient de très bonnes photographies prises par l'auteur.

Gasser, S.M.; Laemmli, U.K. A Glimpse at Chromosomal Order. *Trends in Genetics* 3 : 16-22; 1987. Un article qui passe en revue les différents niveaux d'organisation des chromosomes.

Greider, C.W. Telomers, Telomerase and Senescence. *BioEssays* 12 : 363-369; 1990. Un bon article de revue pour les non-spécialistes.

Grigliatti, T.A. Position Effect Variegation – An Assay for Nonhistone Chromosomal Proteins and Chromatin Assembly and Modification Factors. *Methods in Cell Biology* 35 : 587-627; 1991. Un rapport très facile à lire sur les progrès de la recherche dans ce domaine.

Hayashi, S. et coll. Hybridization of tRNAs of Drosoph*ila melanogaster. Chromosoma*. 76:65-84; 1980. Un rapport technique montrant comment des gènes déterminés peuvent être localisés cytologiquement par hybridation in situ d'ARN radioactif avec les chromosomes.

Hilliker, A.J.; Sharp, C.B. New Perpectives on the Genetics and Molecular Biology of Constitutive Heterochromatin. In *Chromosome Structure and Function*, J.P. Gustaffson & R. Appels, eds. New York : Plenum. Un résumé des progrès de la recherche qui traite surtout de l'hétérochromatine chez *Drosophila*.

Jeffreys, A.J.; Wison, V.; Thein, S.L. Hypervariable Minisatellite Regions in Human DNA. *Nature* 314 : 67-73; 1985. Un des premiers articles sur les empreintes d'ADN.

Jeffreys, A.J. et coll. DNA Fingerprints and Segregation Analysis of Multiple Markers in Human Pedigrees. *American Journal of Human Genetics* 39 : 25-37; 1986. Un article technique sur les profils de transmission des empreintes d'ADN.

Manuelidis, L. A View of Interphase Chromosomes. *Science* 250 : 1533-1540; 1990. Un article de revue facile à lire qui met en rapport la structure du chromosome à la métaphase et à l'interphase.

Chapitre 17

Coulson, A. et al. YACS and the C. elegans Genome. Bioessays. 13: 413–417; 1991. Une revue décrivant l'utilisation de YAC pour construire des contigs pour le génome de ce nématode.

Fleishman, M. D. Whole Genome Random sequencing and Assembly of Haemophilus influenzae Rd. Science. 269: 496–512. L'article rapporte la première séquence génomique complète d'un organisme vivant librement.

Foote, S. ; Vollrath, A. ; Hilton, A. ; Page, D. C. The Human Y Chromosome: Overlapping DNA Clones Spanning the Euchraotic Region. Science. 258: 60–66; 1992. L'utilisation de séquences marqueurs pour établir une carte physique du chromosome Y.

Green,E. D. ; Olson, M. V. Chromosomal Region of the Cystic Fibrosis Gene in Yeast Artificial Chromosomes: A Model for Human Genome Mapping. Science. 250: 94–98; 1990. Un article très compréhensible sur les principes de la cartographie génomique au moyen de YAC.

Murray, J. C. et al. A Comprehensive Human linkage Map with Centimorgan Density. Science. 265: 2049–2054; 1994. Chaque année, Science publie un numéro consacré aux progrès réalisés dans la cartographie du génome humain. Ce numéro décrit l'utilisation des marqueurs moléculaires et d'autres méthodes pour établir une carte à grande échelle du génome humain.

Walter, M. et al. A method for Constructing Radiation Hybrid Maps of Whole Genomes. Nature Genetics. 7: 22–28; 1994. Un article aisément compréhensible au sujet de la technique de cartographie au moyen d'hybrides irradiés.

Chapitre 18

Hendrix, R.W. ; Roberts, J.W. ; Stahl, F.W. ; Weisberg, R.A. Lambda II. Cold Spring Harbor, N.Y. :Cold Spring Harbor Laboratory Press ; 1983. Une série de revues très claires concernant le phage lambda.

Herskowitz, I. Control of Gene Expression in Bacteriophage Lambda. Annual Review of Genetics. 7: 289-324; 1973. Une revue technique de la régulation complexe mais bien analysée des gènes du phage lambda.

Jacob, F.; Monod J. Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. Journal of Molecular Biology. 3:318-356; 1961. Un article classique qui décrit les éléments de l'opéron et les preuves expérimentales qui ont permis de les établir.

Maniatis, T.; Goodbourn, S.; Fischer, J.A. Regulation of Inducible and Tissue-Specific Gene Expression. Science; 236: 1237–1244; 1987. Une revue d'actualité concernant les éléments régulateurs eucaryotiques

Maniatis, T.; Ptashne M. A DNA Operator-Repressor System. Scientific Amercian. Janvier 1976. Cet article décrit les structures moléculaires des composants de l'opéron lac.

Miller, J.H.; Reznikoff W.S., eds. The Operon. Cold Spring Harbour, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1978. Un intéressant recueil d'articles de revue concernant la régulation des gènes dans les bactéries.

Moses, P.B.; Chua N.H. La Lumière et la croissance des plantes. Pour la Science. Juin 1988.

Ptashne, M.; Gilbert W. Genetic Repressors. Scientific American. Juin 1970. La passionnante histoire de la manière dont on a identifié et purifié les répresseurs et, par la même, confirmé les prévisions de Jacob et Monod.

Steitz, J.A. Les SNURPS. Pour la Science. Août 1988.

Trends in Biochemical Sciences. Novembre 1991. «Transcription» Un numéro entièrement consacré à des revues les régulations de transcription eucaryotiques.

Weber, I.T.; Mc Kay D.B.; Steitz T.A. Two Helix DNA Binding Motif of CAP Found in lac Repressor and gal Repressor. Nucleic Acids Research. 10: 5085-5102; 1982. Une discussion des modèles de reconnaissance répresseur-opérateur.

Chapitre 19

Auerbach, C. *Mutation Research*. London: Chapman & Hall; 1976. Un livre de référence, par un chercheur pionnier.

Cairns, J. *Cancer : Science and Society*. New York: W.H. Freeman and Co; 1978. Une discussion fascinante sur les origines des cancers humains et sur le rôle des facteurs de l'environnement.

Croce, C.M.; Koprowski H. La génétique du cancer chez l'Homme. *Pour la Science*. Avril 1978. Un compte rendu très populaire.

Devoret, R. Des tests bactériens pour identifier les cancérigènes potentiels. *Pour la Science*. Octobre 1979. Cet article décrit l'utilisation des mutations pour tester les carcinogènes; il contient aussi certains détails sur les réactions de l'ADN.

Drake, J.W. *The Molecular Basis of Mutation*. San Francisco: Holden-Day; 1970. L'un des rares livres de référence sur le sujet.

Eisenstadt, E. Analysis of Mutagenesis. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology*. F.C. Neidhardt, ed. Washington D.C. : American Society for Microbiology; 1987. Une revue complète des études sur la mutagénèse chez les bactéries.

Friedberg, E.C.; Walker, G.C.; Seide, W. *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington D.C. : American Society for Microbiology, 1995. Un aperçu très complet des mécanismes de mutagénèse et de réparation chez les bactéries et les cellules d'organismes supérieurs. Une excellente mine d'informations sur les maladies génétiques humaines et le cancer et leur relation avec les gènes de réparation.

Miller, J.H. Mutational Specificity in Bacteria. *Annual Review of Genetics*. 17:215-238; 1983. Une discussion de la spécificité des mutagènes chez les bactéries.

Walker, G.C. Mutagenesis and Inducible Responses to Deoxyribonucleic Acid Damage in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*. 48:60-93; 1984. Une revue sur les mutagènes et les mécanismes de réparation, avec une excellente discussion à propos du système SOS.

Walker, G.C. La réponse SOS chez *Escherichia coli*. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology*. F.C. Neidhardt, ed. Washington D.C. : American Society for Microbiology; 1987. Un compte rendu détaillé du modèle de la régulation SOS.

Chapitre 20

Alberts, B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Watson J.D. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland, 1983. Voir pages 239 à 248, une excellente description des aspects moléculaires de la recombinaison, avec de belles figures.

Stahl, F.W. *Genetic Recombination : Thinking About It in Phage and Fungi*. New York: W.H. Freeman and Co; 1979. Un livre court et très technique sur les modèles de la recombinaison.

Stahl, F.W. «The Holliday Junction on its Thirtieth Anniversary», *Genetics* : 138 : 241-246. Une réflexion facile à lire sur le modèle de Holliday et les variantes plus récentes utilisées aujourd'hui pour expliquer la recombinaison.

Whitehouse, H.L.K. *Towards an Understanding of the Mechanism of Heredity*, 3d ed. London: Edward Arnold; 1973. Une excellente introduction générale sur la génétique qui met l'accent sur l'approche historique et les expériences clés. Les modèles de la recombinaison y sont bien traités.

Chapitre 21

Baltimore, D. 1985. «Retroviruses and Retrotransposons: The Role of Reverse Transcription in Shaping the Eukaryotic Genome». Cell 40: 481-482. Une revue concise sur les intermédiaires ribonucléiques dans la transposition.

Berg, D. E., and M. M. Howe. eds. 1989. Mobile DNA. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. Un ensemble de revues pénétrantes sur les éléments transposables des bactéries à l'Homme.

Bukhari, A. I., J. A. Shapiro, and S. L. Adhya. eds. 1977. DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Un vaste ensemble de courts articles de haut niveau concernant des formes de vie supérieures aussi bien qu'inférieures.

Cohen, S. N., and J. A. Shapiro. 1980. «Transposable Genetic Elements». Scientific American (February). Un article fort apprécié mettant l'accent sur les bactéries et les phages.

Fedoroff, N. V. 1984. «Transposable Genetic Elements in Maize». Scientific American (June). Un compte-rendu des premières expériences sur le maïs avec des données plus récentes sur la base moléculaire de la transposition.

Shapiro, J. A., ed. 1983. Mobile Genetic Elements. New York: Academic Press. Un ensemble assez complet de revues couvrant les derniers développements sur la transposition chez les prokaryotes et les eukaryotes.

Chapitre 22

Borst, P., and L. A. Grivell. 1978. «The Mitochondrial Genome of Yeast». Cell 15: 705-723. Une revue non technique sur la biologie moléculaire de l'ADN mitochondrial.

Dujon, B. 1981. «Mitochondrial Genetics and Functions». In The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. J. N. Strathern, E. W. Jones; and J. R. Broach, eds. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. La revue la plus complète disponible. Ce livre est aussi utile pour bien d'autres aspects de la génétique et de la biologie moléculaire de la levure.

Gillham, N. W. 1978. Organelle Heredity. New York: Raven Press. Un article plutôt technique, particulièrement sérieux en ce qui concerne l'analyse génétique.

Griffiths, A. J. F. 1992. «Fungal Senescence». Annual Review of Genetics 26: 349- 370. Une revue montrant comment la plupart des cas de sénescence fungique sont dus à des mutations mitochondriales ou à des plasmides mitochondriaux.

Grivell, L. A. 1983. «Mitochondrial DNA». Scientific American (March). Une excellente revue comprenant une discussion du système de traduction propre aux mitochondries et de l'excission-épissage des introns mitochondriaux.

Linnane, A. W., and P. Nagley. 1978. «Mitochondrial Genetics in Perspective: The Derivation of a Genetic and Physical Map of the Yeast Mitochondrial Genome». Plasmid 1: 324-345. Une très bonne revue sur la génétique et la biologie moléculaire de l'ADNmt chez la levure.

Sager, R. 1965. «Genes Outside Chromosomes». Scientific American (January). Une description très appréciée des premières expériences sur Chlamydomonas.

Sager, R. 1972. Cytoplasmic Genes and Organelles. New York: Academic Press.

Wallace, D. C. 1992. «Mitochondrial Genetics: A Paradigm for Aging and Degenerative Diseases?» Science 256: 628-632. Une revue des différents types de mutation de l'ADNmt chez l'Homme et des affections qui en résultent.

Chapitre 23

Affara, N. A. 1991. «Sex and the Single Y». BioEssays 13: 475-478. La détermination du sexe chez les mamifères.

Ballabio, A., and H. F. Willard. 1992. «Mammalian X-Chromosome Inactivation and the XIST Gene». Current Opinion in Genetics and Development 2: 439-448.

Barlow, D. P. 1994. «Imprinting: A Gamete's Point of View». Trends in Genetics 10: 194-199.

Curtis, D., R. Lehmann, and P. D. Zamore. 1995. «Translational Regulation in Development». Cell 81: 171-178.

Eden, S., and H. Cedar. 1994. «Role of DNA Methylation in the Regulation of Transcription». Current Opinions in Genetics and Development 4: 255-259.

Efstratiadis, A. 1994. «Parental Imprinting of Autosomal Mammalian Genes». Current Opinions in Genetics and Development 4: 265-280.

Ehlich, A., and R. Kppers. 1995. «Analysis of Immunoglobulin Rearrangements in Single B Cells». Current Opinions in Immunology 4: 281-284.

Engelhard, V. H. 1994. «How Cells Present Antigen». Scientific American (August).

Jorgensen, R. A. 1995. «Co-suppression, Flower Color Patterns, and Metastable Gene Expression States». Science 268: 686-691.

Kingston, R. E., and M. R. Green. 1994. «Modeling Eukaryotic Transcriptional Activation». Current Biology 4: 325-332.

Lovell-Badge, R. 1992. «Testis Determination: Soft Talk and Kinky Sex». Current Opinion in Genetics and Development 2: 596-601.

Marshall-Graves, J. A. 1995. «The Origin and Function of the Mammalian Y Chromosome and Y-Borne Genes— An Evolving Understanding». BioEssays 17: 311-320.

McKeown, M. 1992. «Sex Differentation: The Role of Alternative Splicing». Current Opinion in Genetics and Development 2: 299-304.

Moore, T., and D. Haig. 1991. «Genomic Imprinting in Mammalian Development: A Parental Tug-of-War». Trends in Genetics 7: 45-49.

Newman, A. J. 1994. «Pre-mRNA Splicing». Current Opinions in Genetics and Development 4: 298-304.

Parkhurst, S. M., and P. M. Meneely. 1994. «Sex Determination and Dosage Compensation: Lessons from Flies and Worms». Science 264: 924-932.

Pfeifer, K., and S. M. Tilghman. 1994. «Allele-Specific Gene Expression in Mammals: The Curious Case of the Imprinted RNAs». Genes and Development 8: 1867- 1874.

Tijan, R. 1995. «Molecular Machines that Control Genes». Scientific American (February).

Weissman, I. L., and M. D. Cooper. 1993. «How the Immune System Develops». Scientific American (September). Ce numéro est entièrement consacré à la biologie du système immunitaire et contient plusieurs autres articles intéressants.

Chapitre 24

Baserga, R. 1994. «Oncogenes and the Strategy of Growth Factors». Cell 79: 927- 930.

Bowerman, B. 1995. «Determinants of Blastoderm Identity in the Early C.Elegans Embryo». BioEssays 17: 405-414.

Cavenee, W. K., and R. L. White. 1995. «The Genetic Basis of Cancer». Scientific American (March).

Cohen, G. B. R. Ren, and D. Baltimore. 1995. «Modular Binding Domains in Signal Transduction Proteins». Cell 80: 237-248.

Cox, L. S., and D. P. Lane. 1995. «Tumour Suppressors, Kinases and Clamps: How p53 Regulates the Cell Cycle in Response to DNA Damage». BioEssays 17: 501- 508.

Draetta, G. F. 1994. «Mammalian G1 Cyclins». Current Opinions in Cell Biology 6: 842-846.

Edgar, B. A. 1994. «Cell-Cycle Control in a Developmental Context». Current Biology 4: 522-524.

Elledge, S. J., and J. W. Harper. 1994. «Cdk Inhibitors: On the Threshold of Checkpoints and Development». Current Opinions in Cell Biology 6: 847-852.

Fishel, R., and R. D. Kolodner. 1995. «Identification of Mismatch Repair Genes and Their Role in the Development of Cancer». Current Opinions in Genetics and Development 5: 382-396.

Haffner, R., and M. Oren. 1995. «Biochemical Properties and Biological Effects of p53». Current Opinions in Genetics and Development 5: 84-91.

Hartwell, L. H., and M. B. Kastan. 1994. «Cell Cycle Control and Cancer». Science 266: 1821-1828.

Jiricny, J. 1994. «Colon Cancer and DNA Repair: Have Mismatches Met Their Match? Trends in Genetics 10: 164-168.

Kamb, A. 1995. «Cell-Cycle Regulators and Cancer». Trends in Genetics 11: 136-140.

Karin, M., and T. Hunter. 1995. «Transcriptional Control by Protein Phosphorylation: Signal Transmission from the Cell Surface to the Nucleus». Current Biology 5: 747-757.

Kenyon, C. 1995. «A Perfect Vulva Every Time: Gradients and Signaling Cascades in C.Elegans». Cell 82: 171-174.

Maruta, H., and A. W. Burgess. 1994. «Regulation of the Ras Signaling Network». BioEssays 16: 489-496.

Murray, A. W. 1995. «The Genetics of Cell Cycle Checkpoints». Current Opinions in Genetics and Development 5: 5-11.

Neer, E. J. 1995. «Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals». Cell 80: 249-257.

Nigg, E. A. 1995. «Cyclin-Dependant Protein Kinases: Key Regulators of the Eukaryotic Cell Cycle». BioEssays 17: 471-480.

Picksley, S. M., and D. P. Lane. 1994. «p53 and Rb: Their Cellular Roles». Current Opinions in Cell Biology 6: 853-858.

Rhyu, M. S., and J. A. Knoblich. 1995. «Spindle Orientation and Asymetric Cell Fate». Cell 82: 523-525.

Sohn, R. H., and P. J. Goldschmidt-Clermont. 1994. «Profilin: At the Crossroads of Signal Transduction and the Actin Cytoskeleton». BioEssays 16: 465-472.

Sullivan, W., and W. E. Theurkauf. 1995. «The Cytoskeleton and Morphogenesis of the Early Drosophila Embryo». Current Opinions in Cell Biology 7: 18-22.

Thomas, B. J., and S. L. Zipursky. 1994. «Early Pattern Formation in the Developing Drosophila Eye». Trends in Cell Biology 4: 389-394.

Weinberg, R. A. 1995. «The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control». Cell 81: 323-330.

Zipursky, S. L., and G. M. Rubin. 1994. «Determination of Neuronal Cell Fate: Lessons from the R7 Neuron of Drosophila». Annual Review of Neuroscience 17: 373-397.

Chapitre 25

Capecchi, M. R. 1994. «Targeted Gene Replacement». Scientific American (March). Description des approches visant à modifier la structure des gènes en exploitant la machinerie cellulaire impliquée dans la réparation de l'ADN et la recombinaison homologue. Ecrit par un pionnier de cette technologie.

DiNardo, S., J. Heemskerk, S. Dougan, and P. H. O'Farrell. 1994. «The Making of a Maggot: Patterning the Drosophila Embryonic Epidermis». Current Opinion in Genetics and Development 4: 529-534.

Duboule , D., and G. Morata. 1994. « Colinearity and Functional Hierarchy among the Genes of the Homeotic Complexes». Trends in Genetics 10: 358-364.

Gonzalez-Crespo, S., and M. Levine. 1994. «Related Target Enhancers for Dorsal and NF-kappa B-Signaling Pathways». Science 264: 255-258.

Hulskamp, M., and D. Tautz. 1991. «Gap Genes and gradients— The Logic Behind the Gaps». BioEssays 13: 261-268.

Ip, Y. T., and M. Levine. 1994. «Molecular Genetics of Drosophila Immunity». Current Opinion in Genetics and Development 4: 672-677.

Kenyon C. 1994. «If Birds Can Fly, Why Can't We? Homeotic Genes and Evolution». Cell 78: 175-180.

Kornberg, T. B., and T. Tabata. 1993. «Segmentation of the Drosophila Embryo». Current Opinions in Genetics and Development 3: 585-594.

Klingler, M. 1994. «Segmentation in Insects: How Singular is Drosophila?». BioEssays 16: 391-392.

Krumlauf, R. 1994. «Hox Genes In Vertebrate Development». Cell 78: 191-201.

Lawrence, P. A., and G. Morata. 1994. «Homeobox Genes: Their Function in Drosophila Segmentation and Pattern Formation». Cell 78: 181-189.

McGinnis, W., and M. Kuziora. 1994. «The Molecular Architecture of Body Design». Scientific American (February).

Meyerowitz, E. M. 1994. «Genetics of Flower Development». Scientific American (November). Des familles similaires de facteurs de transcription se trouvent à la base de mutations homéotiques affectant le développement des plantes.

Orlando, V., and R. Paro. 1995. «Chromatin Multiprotein Complexes Involved in the Maintenance of Transcription Patterns». Current Opinions in Genetics and Development 5: 174-179.

Perrimon, N., and C. Desplan. 1994. «Signal Transduction in the Early Drosophila Embryo: When Genetics Meets Biochemistry». Trends in Biochemical Sciences 19: 509-513.

Quiring, R., U. Walldorf, U. Kloter, and W. Gehring. 1994. «Homology of the Eyeless Gene of Drosophila to the Small Eye Gene in Mice and Aniridia in Humans. Science 265: 785-789.

Schpbach, T., and S. Roth. 1994. «Dorsoventral Patterning in Drosophila Oogenesis». Current Opinion in Genetics and Development 4: 502-507.

St. Johnston, R. D. 1994. «RNA Localization: Getting to the Top». Current opinion in Genetics and Development 4: 54-56.

St. Johnston, R. D. 1995. «The Intracellular Localization of Messenger RNAs». Cell 81: 161-170.

Tautz, D., and R. J. Sommer. 1995. «Evolution of Segmentation Genes in Insects». Trends in Genetics 11: 23-27.

Wolpert, L. 1994. «Positional Information and Pattern Formation in Development». Developmental Genetics 15: 485-490.

Chapitre 26

Beadle, G.W. 1980. The Ancestry of Corn. *Scientific American*. Janvier 1980. Une revue qui retrace l'évolution qui a conduit à l'espèce contemporaine.

Bodmer, W.F.; Cavalli-Sforza L.L. *Genetics, Evolution and Man*. New York: W.H.Freeman et Cie; 1976.

Cavalli-Sforza L.L., P. Menozzi, and A. Piazza. 1994. *The History and Geography of Human Genes*. Princeton, N.J.: Princeton University Press. Une discussion fouillée de la variation génétique chez l'homme, son histoire et les facteurs qui la façonnent; inclut des tables complètes et récentes des fréquences des gènes humains.

Clarke, B. The causes of Biological Diversity. *Scientific American*. Août 1975. Une vulgarisation qui met l'accent sur le polymorphisme génétique.

Crow, J.F. Genes That Violate Mendel's Rules. *Scientific American*. Février 1979. Un article fort intéressant sur un phénomène appelé "distorsion de la ségrégation" (qui n'est pas repris dans notre ouvrage) et sur son effet au sein de populations.

Dobzhansky, T. *Genetics and the Origin of Species*. New York: Columbia University Press; 1951. "Le" classique qui fait une synthèse de la génétique des populations et du processus d'évolution. L'ouvrage le plus important sur l'évolution depuis *L'origine des espèces* de Darwin.

Ford, E.B. *Ecological Genetics*. 3e ed. London: Chapman & Hamm; 1971. Un traitement non-mathématique du rôle de la variation génétique dans la nature, qui met l'accent sur la variation morphologique.

Futuyma, D.J. *Evolutionary Biology*. Sunderland Mass.: Sinauer Associates; 1979. Une des meilleures discussions de la génétique des population, de l'écologie et de l'évolution approchée à la fois des points de vue théorique et expérimental.

Hartl, D. *Principles of Population Genetics*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates; 1980.

Lerner, I.M.; Libby, W.J. *Hereditary, Evolution and Society*. 2e ed. New York: W.H. Freeman and Co; 1976. Un ouvrage de vulgarisation pour les non-scientifiques.

Lewontin, R.C. *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. New York: Columbia University Press; 1974. Une discussion du rôle prévalent de la variation génétique dans les populations naturelles. Les variations tant morphologiques qu'au niveau de protéines individuelles y sont abordées.

Lewontin, R.C. *Human Diversity*. New York: Scientific American Books; 1982. Applique les concepts de la génétique des populations à la diversité des types humains et à l'évolution.

Li, W.H., and D. Graur. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sunderland, Mass.: Sinauer. Excellente revue des facteurs et taux d'évolution des séquences de protéines et d'ADN.

Scientific American. Septembre 1978. Evolution. Ce volume contient différents articles se rapportant à la génétique des populations.

Wilson, A.C. The Molecular Basis of Evolution. *Scientific American*. Octobre 1985.

Chapitre 27

Bodmer, W.F.; Cavalli-Sforza L.L. Intelligence and Race. *Scientific American*. October 1970. Une excellente vulgarisation comprenant une discussion sur l'héritabilité.

Falconer, D.S. *Introduction to Quantitative Genetics*. 2e ed. New York: Ronald Press; 1981. Un ouvrage très apprécié qui fait la part belle aux traitements mathématiques.

Feldman, M.W.; Lewontin R.C. The Heritability Hangup. *Science*. 190:1163-1168; 1975. Une discussion sur la signification du concept d'héritabilité et sur ses limites, particulièrement en ce qui concerne l'intelligence humaine.

Lewontin, R.C. The Analysis of Variance and the Analysis of Causes. *American Journal of Human Genetics*. 26:400-411; 1974. Une discussion sur la signification de l'analyse de la variance génétique considérée comme une méthode permettant de déterminer les rôles respectifs de l'hérédité et de l'environnement dans l'établissement du phénotype.

Lewontin, R.C. *Human Diversity*. New York: Scientific American Books; 1982. Comporte une discussion sur la variation quantitative au sein des populations humaines.

BCU CENTRAL LIBRARY

Glossaire

A Adénine ou adénosine

Aberration chromosomique Tout changement de la structure ou du nombre des chromosomes.

Accroissement contrôlé de la variation naturelle Utilisation d'agents mutagènes pour développer des variétés qui peuvent accroître les rendements agricoles.

Achondroplasie Un type de nanisme de l'homme qui se transmet comme un phénotype autosomique dominant.

Acide aminé Résidu peptidique ; l'élément de base dans la construction des protéines (ou des polypeptides).

Acide désoxyribonucléique Voir **ADN.**

Acide ribonucléique Voir **ARN.**

Adaptation Dans le sens évolutif du terme, caractère héréditairement transmissible du phénotype d'un individu qui accroît ses chances de survie et de reproduction dans l'environnement existant.

Adénine Base purique qui s'apparie à la thymine dans la double hélice d'ADN.

Adénosine Nucléoside dont la base est l'adénine.

Adénosine monophosphate cyclique Voir **AMP cyclique.**

Adénosine triphosphate Voir **ATP.**

ADN (acide désoxyribonucléique) Un double enchaînement de nucléotides dont le sucre est le désoxyribose ; substance de base dont sont formés les gènes.

ADNc Voir **ADN complémentaire.**

ADN chimérique Voir **ADN recombinant.**

ADN complémentaire (ADNc) ADN synthétique produit par la trancription d'un ARN spécifique au moyen de la transcriptase inverse.

ADNcp ADN chloroplastique.

ADN donneur Tout ADN qui peut être utilisé pour un clonage.

ADN étranger ADN d'un autre organisme.

ADN espaceur ou instertitiel ADN répétitif localisé entre les gènes. Sa fonction n'est pas comprise.

ADN microsatellite Un type d'ADN répétitif basé sur la répétition de courts segments tels que des dinucléotides.

ADN minisatellite Un type de séquences répétitives d'ADN basé sur la répétition de courtes séquences possédant un cœur commun ; utilisé pour les empreintes digitales d'ADN.

ADNmt ADN mitochondrial.

ADN polymérase Une enzyme pouvant synthétiser de nouveaux brins d'ADN à partir d'une matrice d'ADN ; plusieurs enzymes de ce type existent.

ADN polymorphes amplifiés au hasard Voir **RAPD.**

ADN recombinant Nouvelle séquence d'ADN formée par l'union covalente de deux molécules d'ADN non homologues.

ADN redondant Voir **ADN répétitif.**

ADN répétitif ADN redondant ; séquences d'ADN qui sont présentes en copies multiples dans chaque jeu de chromosomes.

ADN satellite ADN qui migre en une bande distincte de celle de l'ADN chromosomique en gradient de densité, du fait d'une différence dans sa composition en nucléotides.

ADN-T Portion du plasmide Ti d'*Agrobacterium* qui s'intègre dans le génome de la plante hôte.

ADP Adénosine diphosphate.

Agent alkylant Substance chimique susceptible de transférer un groupement alkyle (par exemple un groupement méthyle ou éthyle) sur une autre molécule. Beaucoup de substances mutagènes agissent par alkylation.

Agent intercalant Substance pouvant s'insérer entre les plateaux des bases d'une double hélice d'ADN et entraîner la formation d'une mutation de décalage de phase.

Agent mutagène Une substance capable d'accroître le taux de mutation.

Ala Alanine (un acide aminé).

Albinos Un phénotype «blanc» caractérisé par une absence de pigment et déterminé par une mutation dans un gène codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse des pigments.

Allèle Un des multiples états possibles d'un locus génétique.

Allèle dominant Un allèle exprimant son effet phénotypique même à l'état hétérozygote lorsqu'il est associé à un allèle récessif ; donc si *A* est dominant vis-à-vis de *a*, *AA* et *Aa* ont le même phénotype.

Allèle fixé Un allèle qui est homozygote chez tous les membres de la population étudiée, de telle sorte qu'aucun autre allèle de ce locus n'est représenté dans la population.

Allèle mutant Allèle différent de celui que l'on trouve chez l'organisme standard, ou sauvage.

Allèle récessif Allèle dont l'effet phénotypique n'est pas exprimé dans un hétérozygote.

Allélisme multiple L'existence de plusieurs allèles connus pour un gène donné.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Allopolyploïde Voir **amphidiploïde.**

Alternance de générations Alternance des stades gamétophyte et sporophyte dans le cycle vital d'une plante.

Amélioration des plantes Application de l'analyse génétique au développement de nouvelles lignées végétales mieux appropriées aux activités humaines.

Amélioration des races animales Application pratique de l'analyse génétique au développement de lignées d'animaux domestiques adaptées aux besoins humains.

Amniocentèse Technique permettant de déterminer le génotype d'un embryon ou d'un fœtus in utero et ne présentant qu'un risque minime pour la mère ou pour l'enfant.

AMP Adénosine monophosphate.

AMP cyclique (AMPc ou adénosine monophosphate cyclique) Molécule qui joue un rôle-clé dans la régulation de plusieurs processus cellulaires.

Amphidiploïde Allopolyploïde ; un polyploïde issu de l'union de deux jeux distincts de chromosomes et de leur doublement ultérieur.

Amplificateur (ou enhancer) Séquence régulatrice opérant en *cis* qui peut élever le niveau d'expression à partir d'un promoteur situé dans son voisinage. De nombreux *amplificateurs tissu-spécifiques* interviennent dans la détermination du profil spatial d'expression des gènes chez les eucaryotes supérieurs. Les amplificateurs sont capables d'agir sur des promoteurs distants de plusieurs dizaines de kilobases et peuvent être situés en 5' ou en 3' des promoteurs qu'ils régulent.

Amplification Production de plusieurs copies d'une région limitée de l'ADN.

Amplification génique Le processus par lequel le nombre de copies d'un segment chromosomique est augmenté dans une cellule somatique.

Analogue de base Substance chimique dont la structure moléculaire est voisine de celle d'une base nucléique ; en raison de cette ressemblance structurale, l'analogue agit souvent comme un mutagène.

Analyse de tétrades Utilisation de tétrades (voir définition de ce terme) pour étudier le comportement des chromosomes et des gènes à la méiose.

Anaphase Etape de la division cellulaire durant laquelle les chromosomes migrent vers les pôles de la cellule.

Anémie à cellules falciformes Maladie humaine potentiellement létale causée par une mutation dans le gène d'une des chaînes polypeptidiques de l'hémoglobine, la protéine transporteuse d'oxygène. La molécule altérée provoque la formation de globules rouges en forme de faucilles.Transmise sous une forme autosomique récessive.

Angström (Å) Unité de longueur égale à 10^{-10} mètres ; beaucoup de scientifiques préfèrent utiliser le nanomètre ($1nm = 10^{-9}m = 10$ Å).

Anneau de Balbiani Zone d'expansion de la chromatine (puff) dans un chromosome polytène.

Anticodon Triplet de nucléotides dans une molécule d'ARNt qui s'aligne sur un codon spécifique dans l'ARNm sous le contrôle du ribosome, de sorte que l'acide aminé porté par l'ARNt soit incorporé dans la chaîne protéique en cours de synthèse.

Anticorps Protéine (immunoglobuline) produite par le système immunitaire, qui reconnaît une molécule étrangère (antigène) et s'y lie ; si l'antigène est à la surface d'une cellule, cette liaison entraîne l'agrégation des cellules étrangères et leur destruction ultérieure.

Antigène Molécule (souvent présente à la surface d'une cellule) qui déclenche la synthèse d'anticorps qui vont la reconnaître et s'y lier.

Antigènes d'histocompatibilité Antigènes déterminant l'acceptation ou le rejet d'une greffe de tissus.

Antiparallèle Terme utilisé pour décrire l'orientation opposée des deux brins de la double hélice d'ADN ; l'extrémité 5' d'un brin s'aligne sur l'extrémité 3' de l'autre brin.

Appariement Voir **enlacement.**

Appariement par assortiment positif Situation où les phénotypes semblables s'apparient plus souvent que prévu sur base du hasard pur et simple.

Appariement par assortiment négatif ou contre-assortiment Appariement préférentiel entre des partenaires aux phénotypes dissemblables.

Arbre généalogique (pedigree humain) Un «arbre familial», construit avec des symboles génétiques standard, montrant les profils de transmission de traits phénotypiques spécifiques.

Arg Arginine (un acide aminé).

Armature La charpente centrale d'un chromosome à laquelle les boucles de l'ADN solénoïdal se fixent ; il est essentiellement constitué de topoisomérase.

ARN (acide ribonucléique) Acide nucléique monocaténaire similaire à l'ADN mais contenant du ribose au lieu de désoxyribose et de l'uracile au lieu de thymine.

ARNc Voir **ARN complémentaire.**

ARN complémentaire (ARNc) ARN synthétique produit par la transcription in vitro d'un ADN simple brin déterminé.

ARN de transfert Voir **ARNt.**

ARNm (ARN messager) Une molécule d'ARN dont la séquence nucléotidique est traduite en chaîne polypeptidique (ou protéine) grâce à l'action des ribosomes.

ARN messager Voir **ARNm.**

ARNm monocistronique Un ARNm qui code pour une seule chaîne polypeptidique.

ARNm polycistronique ARN messager qui code pour plus d'une protéine.

ARN nucléaire hétérogène (ARNhn) Une collection d'ARN associés au noyau et comportant des précurseurs d'ARN messagers et d'autres types d'ARN.

ARN polymérase Une enzyme qui catalyse la synthèse d'un brin d'ARN à partir d'ADN comme matrice. Chez les eucaryotes, il y a plusieurs classes d'ARN polymérases. Les gènes de structure des protéines sont transcrits par l'ARN polymérase II.

ARNr (ARN ribosomique) Classe de molécules d'ARN codées par l'organisateur nucléolaire et jouant un rôle indispensable (mais mal compris) dans la structure et la fonction du ribosome.

ARN ribosomique Voir **ARNr.**

ARNt (ARN de transfert) Une classe de petites molécules d'ARN qui transportent des acides aminés spécifiques vers les ribosomes au cours de la traduction ; l'acide aminé est inséré dans le polypeptide en croissance lorsque l'anticodon de l'ARNt s'apparie avec un codon sur l'ARNm en cours de traduction.

ARNt isoaccepteurs Les différents types d'ARN de transfert associés à un acide aminé déterminé.

Ascospore Spore sexuée de certaines espèces de champignons chez lesquelles les spores sont contenues dans un sac appelé asque.

Asn Asparagine (un acide aminé).

Asp Aspartate ou acide aspartique (un acide aminé).

Asque Chez les champignons, sac qui contient une tétrade ou une octade d'ascospores.

Assortiment indépendant Voir **lois de Mendel (deuxième loi).**

ATP (Adénosine triphosphate) La «molécule énergétique» des cellules ; chez les eucaryotes, elle est synthétisée essentiellement dans les mitochondries et les chloroplastes ; l'énergie dérivée de la déphosphorylation de l'ATP alimente de nombreuses réactions cellulaires importantes.

Atténuateur Région adjacente à certains gènes de structure ou opérons de voies de biosynthèse (du tryptophane, notamment) ; en présence du ou des

produit(s) final(s) de ces voies, cette région réduit le taux de transcription des gènes de structure.

Auto-assemblage Capacité qu'ont certaines structures biologiques multimériques de s'assembler à partir de leurs sous-unités grâce aux mouvements aléatoires de celles-ci et à la formation de liaisons chimiques faibles entre surfaces présentant des configurations complémentaires.

Autoféconder Féconder des œufs avec les gamètes mâles du même individu.

Autophosphorylation Le processus par lequel une protéine kinase phosphoryle des résidus d'acides aminés de sa propre séquence.

Autopolyploïde Polyploïde formé par le dédoublement spontané d'un génome.

Autoradiogramme Image formée de taches noires qui est obtenue sur un film ou une émulsion photographique dans la technique de l'autoradiographie.

Autoradiographie Procédé qui consiste à incorporer une substance radioactive dans des cellules puis à impressionner une émulsion photographique afin de révéler la trace et la localisation des structures cellulaires qui ont incorporé l'élément radioactif.

Autosome Tout chromosome qui n'est pas un chromosome sexuel.

Auxotrophe Souche d'un microorganisme qui ne peut proliférer qu'en présence d'un supplément nutritif non requis par les organismes sauvages.

BAC Chromosome bactérien artificiel ; un plasmide F manipulé pour servir de vecteur de clonage capable de porter de grands inserts.

Bactérie lysogène Une cellule bactérienne susceptible de lyse spontanée due, par exemple, au découplage d'un prophage et du chromosome bactérien.

Bactériophage (phage) Virus qui infecte les bactéries.

Banque d'ADN Une collection de clones d'ADN préparés à partir de l'ADN d'un donneur.

Banque d'ADNc Une banque composée d'ADNc, c'est-à-dire qui n'est pas nécessairement représentative de tous les ARNm.

Banque d'expression Une banque dans laquelle le vecteur porte des signaux de transcription qui permettent à n'importe quel insert cloné de produire un ARN et finalement un produit protéique.

Banque génomique Une banque couvrant un génome entier.

Bases azotées Types de molécules formant une partie importante des acides nucléiques, composées de structures cyclisées contenant des atomes d'azote ; des liaisons hydrogène entre bases relient les deux brins d'une double hélice d'ADN.

Blastoderme Chez l'embryon d'un insecte, couche de cellules entourant complètement la masse interne du vitellus de l'œuf.

Blastoderme cellulaire Le stade du développement des blastodermes d'insectes où chaque noyau est entouré d'une membrane cellulaire différente.

Blastoderme syncytial Chez les insectes, le stade de développement du blastoderme qui précède la formation des membranes cellulaires autour des noyaux individuels de l'embryon précoce.

Blastula Un stade précoce du développement des embryons de vertébrés inférieurs où ces embryons sont encore constitués d'une cavité entourée de cellules. Ce stade précède la gastrulation.

Boîte de Pétri Boîte circulaire plate dans laquelle les microorganismes sont cultivés après étalement à la surface d'un milieu gélosé solide.

Boucle d'autorégulation Le processus par lequel l'expression d'un gène est régulée par son propre produit.

Boucle de rétroaction (feedback loop) Voir **boucle d'autorégulation.**

Bourgeon Cellule fille produite lors de la division mitotique chez la levure ; une des cellules filles conserve la paroi cellulaire de la cellule mère, l'autre (le bourgeon) synthétise une nouvelle paroi.

Bouts collants Voir **extrémités cohésives.**

Brachydactylie Un phénotype humain, caractérisé par des doigts inhabituellement courts, qui se transmet en général sous une forme autosomique dominante.

Brin précoce Dans la réplication de l'ADN, le brin qui est synthétisé dans la direction de 5' vers 3' par une polymérisation continue à partir d'une extrémité 3'.

Brin tardif Au cours de la réplication de l'ADN, le brin qui est synthétisé dans une direction de 3' vers 5' apparente, suite à la ligature de courts fragments synthétisés individuellement dans la direction de 5' vers 3'.

C Cytosine ou cytidine.

Cadre de lecture La séquence de codons qui est déterminée par la lecture des nucléotides par groupes de trois à partir d'un codon d'initiation spécifique.

Cadre de lecture non attribué (ou **URF** pour **Unassigned Reading Frame,** en anglais) Un cadre de lecture ouvert (voir ORF) dont la fonction n'a pas encore été déterminée.

Cadre de lecture ouvert (ou **ORF** pour **Open Reading Frame,** en anglais) Une région d'ADN ou d'ARN, identifiée par séquençage des nucléotides, qui possède des codons d'initiation et de terminaison et dès lors représente probablement un gène. Souvent synonyme de «cadre de lecture non attribué» (voir cette définition).

Cal Amas de cellules de plantes non-différenciées.

Cancer Syndrome impliquant la division anormale et incontrôlée de cellules eucaryotiques.

Cancer colorectal héréditaire sans polypes (HNPCC) Une des prédispositions au cancer les plus fréquentes.

CAP Voir **Protéine CAP.**

Caractère canalisé Caractère dont le phénotype est stabilisé par le développement malgré une variation parfois importante au niveau génétique ; cette variation est révélée lors de perturbations génétiques (mutations) ou de l'environnement.

Caractère cellulaire autonome Chez les organismes multicellulaires, un caractère qui ne se manifeste que dans les cellules qui possèdent le génotype correspondant. Inversément, un caractère non autonome est un caractère dont le phénotype s'exprime dans d'autres cellules, indépendamment de leurs génotypes.

Caractère (ou trait) familial Un caractère partagé par les membres d'une famille.

Caractère (ou trait) héréditaire Attribut des individus d'une espèce pour lequel plusieurs états différents définis génétiquement peuvent être identifiés.

Caractères sexuels secondaires Les phénotypes des tissus somatiques qui sont liés au sexe des animaux sexuellement dimorphiques.

Carcinogène Substance qui provoque l'apparition d'un cancer.

Carré de Punnett Grille utilisée pour représenter les zygotes résultant de différentes fusions de gamètes dans un croisement déterminé.

Carte chromosomique Voir **carte de liaison génétique.**

Carte de dénaturation Carte d'un segment d'ADN indiquant les emplacements des boucles locales de dénaturation correspondant à des régions à contenu en AT élevé.

Carte de liaison ou carte factorielle La carte d'un chromosome ou d'un fragment de chromosome ; une carte de loci chromosomiques (ou carte factorielle), basée sur des fréquences de recombinaison.

Carte de restriction Carte d'une région chromosomique montrant les positions des cibles d'une ou de plusieurs enzymes de restriction.

Carte des foyers Carte des territoires présomptifs du blastoderme de la drosophile (territoires destinés à devenir des structures adultes particulières), basée sur les fréquences de certains types de mosaïques.

Carte des territoires présomptifs Une carte d'un embryon désignant les aires qui se développeront en tissus et organes spécifiques.

Carte génique La séquence linéaire de sites mutants au sein d'un gène, établie à partir des fréquences de recombinaison interalléliques (intragéniques).

Cartographie par les RFLP Une technique dans laquelle les polymorphismes de fragmentation de l'ADN par restriction sont utilisés comme références pour la localisation par rapport à des gènes connus ou à d'autres loci de RFLP.

Cartographie physique Détermination des positions des fragments génomiques clonés.

Caryotype Garniture chromosomique complète d'un individu ou d'une cellule, telle qu'on peut l'observer en métaphase mitotique.

Cascade de transmission des signaux Une suite d'événements, tels que des phosphorylations de protéines, qui transmettent un signal reçu au niveau d'un récepteur membranaire, par l'entremise d'une série de molécules intermédiaires, jusqu'à des molécules régulatrices, comme les facteurs de transcription, qui sont modifiées en réponse à ce signal.

Cation Ion chargé positivement (comme K^+).

CDK Voir **protéine kinase cycline-dépendante.**

Cellule à haute fréquence de recombinaison (Hfr) Chez *E. coli*, une cellule ayant intégré son facteur de fertilité dans le chromosome bactérien ; une cellule donneuse mâle.

Cellule aneuploïde Une cellule possédant un petit nombre de chromosomes en plus ou en moins du nombre normal.

Cellule anucléée Une cellule sans noyau.

Cellule eucaryotique Une cellule contenant un noyau.

Cellule F^+ Chez *E. coli*, une cellule possédant un facteur de fertilité ; une cellule mâle.

Cellule F^- Chez *E. coli*, une cellule sans facteur de fertilité ; une cellule femelle.

Cellule initiale (Blast cell ou stem cell) Une cellule qui se divise, en général asymétriquement, pour donner deux cellules différentes. L'une est une cellule initiale comme la cellule parentale, et l'autre une cellule qui entame un processus de différenciation. De cette manière, une population de cellules peut se maintenir en état de prolifération permanent tout en fournissant des cellules en cours de différenciation.

Cellule procaryotique Cellule sans membrane nucléaire et donc sans noyau distinct.

Cellule somatique Cellule qui n'est pas dans la lignée germinale. Ses gènes ne seront pas transmis à la descendance.

Cellules initiales embryonnaires (cellules ES ou IE) Ces lignées cellulaires en culture, établies à partir de cellules embryonnaires très jeunes, sont essentiellement totipotentes. Elles peuvent dès lors être implantées dans un embryon et envahir de nombreux ou même tous les tissus de l'animal en cours de développement y compris, surtout, la lignée germinale. Les manipulations de ces cellules sont utilisées de manière intensive en génétique des souris pour effectuer des inactivations ciblées de gènes

Cellules nourricières Les cellules-sœurs de l'ovocyte chez les insectes. Les cellules nourricières produisent la majorité du contenu cytoplasmique de l'ovocyte mature.

Centimorgan (cM) Voir **unité de cartographie.**

Centre organisateur d'un microtubule La portion du cytosquelette microtubulaire où sont groupées toutes les extrémités moins des microtubules. Ordinairement il se situe près du centre de la cellule.

Centromère Kinétochore ; région du chromosome présentant un étranglement où s'attachent les fibres du fuseau mitotique lors de la division cellulaire.

Champ de développement (development field) Un ensemble de cellules qui interagissent pour former une structure au cours du développement (par exemple, un embryon, un tissu, un organe, un membre, etc.).

Champignon homothallique Une espèce de champignon chez laquelle une spore sexuée peut accomplir la totalité du cycle sexuel (comparez avec **champignon hétérothallique**).

Champignon hétérothallique Un type de champignon où deux types sexuels différents doivent s'unir pour enclencher le cycle reproducteur.

Chasse Voir **expérience de marquage et chasse.**

Chiasma Structure cruciforme qui s'élabore fréquemment entre les chromatides de chromosomes homologues lors de la méiose et au niveau de laquelle ont lieu les crossing-over.

Chimère Voir **mosaïque.**

Chloroplaste Organite des cellules végétales qui contient la chlorophylle et où se produit la photosynthèse.

Chromatide Une des deux répliques-sœurs du chromosome formées durant la phase de synthèse précédant la division cellulaire.

Chromatine Substance qui constitue les chromosomes ; on sait à présent qu'elle comprend l'ADN ainsi que les protéines et l'ARN chromosomiques.

Chromocentre Site au niveau duquel les chromosomes polytènes paraissent attachés ensemble.

Chromomère Petite structure granulaire visible sur les chromosomes durant la prophase méiotique ou mitotique.

Chromosome Arrangement linéaire continu d'ADN codant (gènes) et non-codant, souvent associé à des protéines et de l'ARN.

Chromosome acentrique Chromosome dépourvu de centromère.

Chromosome acrocentrique Chromosome dont le centromère est situé un peu plus près d'une extrémité que de l'autre.

Chromosome arlequin Chromosome dont les chromatides-sœurs se colorent différentiellement, l'une apparaissant sombre et l'autre claire.

Chromosome de Philadelphie Translocation entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 trouvée fréquemment dans les globules blancs de malades souffrant de leucémie myéloïde chronique.

Chromosome dicentrique Un chromosome comportant deux centromères.

Chromosomes en écouvillon («lampbrush») Grands chromosomes présents dans les ovocytes d'amphibiens, pourvus de boucles latérales d'ADN et qui, au microscope, ont l'apparence d'un écouvillon.

Chromosomes hétéromorphes Une paire de chromosomes montrant une certaine ressemblance mais différents par la taille, la forme et la manière de se colorer.

Chromosomes homéologues Chromosomes partiellement homologues, indiquant une homologie ancestrale.

Chromosomes homologues Chromosomes s'appariant l'un avec l'autre à la méiose.

Chromosome métacentrique Un chromosome pourvu d'un centromère en son milieu.

Chromosome polytène Chromosome géant produit par un processus endomitotique où des répliques multiples de l'ADN restent accolées en un nombre haploïde de chromosomes.

Chromosome satellite Chromosome qui semble être une addition aux chromosomes normalement présents dans le génome.

Chromosome sexuel Chromosome dont l'absence ou la présence est corrélée avec le sexe de l'individu porteur ; les chromosomes sexuels jouent un rôle dans la détermination du sexe.

Chromosome télocentrique Chromosome qui a son centromère à une extrémité.

Cis - dominance Capacité d'un gène d'influencer l'expression de gènes adjacents sur le même chromosome.

COPYRIGHT CEFIM UNIVERSITY LIBRARY

Cistron Initialement défini comme l'unité génétique de fonction ou de complémentation (au sein de laquelle deux mutations ne peuvent pas se complémenter dans un test cis-trans). Assimilé au gène comme étant la région d'ADN codant pour une chaîne polypeptidique (ou un ARN ribosomique ou de transfert).

Clonage à l'aveugle (Shotgun technique) Clonage au hasard d'un grand nombre de fragments d'ADN différents en prélude à la sélection d'un clone particulier.

Clone (1) Population de cellules génétiquement identiques ou d'individus issus d'un ancêtre commun par division cellulaire asexuée. (2) (*familièrement*) Tout individu produit de façon asexuée de telle sorte qu'il soit génétiquement identique à son «parent». (3) Voir **clone d'ADN.**

Clone d'ADN Un morceau d'ADN qui a été inséré dans un vecteur, tel qu'un plasmide ou un phage, et ensuite répliqué pour donner lieu à des copies multiples.

cM (centimorgan) Voir **unité de cartographie.**

Code dégénéré Un code génétique où certains acides aminés peuvent être spécifiés par plus d'un codon.

Code génétique Désigne l'ensemble des correspondances existant entre les triplets de paires de nucléotides de l'ADN et les acides aminés de la protéine.

Codominance Situation dans laquelle un hétérozygote exprime d'égale façon les caractères phénotypiques de deux allèles.

Codon Triplet de nucléotides qui, dans l'ADN, code pour un acide aminé.

Codon ambre Codon UAG, un codon non-sens.

Codon non-sens Un codon pour lequel n'existe aucun ARNt normal ; la présence d'un codon non-sens entraîne l'arrêt de la traduction (l'achèvement de la chaîne polypeptidique). Les trois codons non-sens sont appelés ambre, ocre et opale.

Codon ocre Le codon non-sens UAA.

Codon opale Le codon non-sens UGA.

Coefficient de coïncidence Rapport du nombre observé au nombre attendu de doubles recombinants.

Coefficient de consanguinité La probabilité qu'un zygote hérite de deux copies *tout à fait identiques* d'un gène ancestral.

Coefficient de corrélation Evaluation statistique du degré auquel l'évolution d'une variable est liée à celle d'une autre.

Coefficient de régression Pente de la ligne droite qui relie le plus étroitement deux variables entre lesquelles existe une corrélation.

Coefficient(s) de sélection L'excès ou le défaut d'aptitude d'un génotype par rapport à un autre.

Cointégrat Le produit de la fusion de deux éléments circulaires pour former un seul cercle plus grand.

Colinéarité Correspondance entre la position d'une mutation dans un gène et celle d'une substitution d'un acide aminé dans le polypeptide correspondant.

Colonie Clone visible de cellules.

Compartimentation polyclonale L'existence de lignes de démarcation qui restreignent l'extension spatiale de clones de cellules lors du développement de l'organisme.

Compensation de la dose génique Chez les organismes qui utilisent un mécanisme de détermination chromosomique du sexe (tel que XX et XY), le processus qui permet aux gènes standard sur les chromosomes sexuels d'être exprimés à un niveau identique chez les mâles et les femelles, quel que soit le nombre de chromosomes sexuels. Chez les mammifères, la compensation de la dose de gènes opère en ne maintenant qu'un seul chromosome X en activité dans chaque cellule ; chez *Drosophila*, elle opère en suractivant le chromosome X mâle.

Compétent Capable d'absorber de l'ADN exogène et donc d'être transformé.

Complémentation Production d'un phénotype sauvage lors de la combinaison de deux mutations différentes dans un diploïde ou un hétérocaryon.

Complémentation (de gènes) Production d'un phénotype sauvage par complémentation intergénique entre allèles mutants de différents loci.

Complémentation de fonction L'utilisation d'un fragment d'ADN cloné provenant d'un organisme sauvage pour transformer un mutant en organisme sauvage ; sert à identifier un clone contenant un gène spécifique.

Complexe synaptonémal Structure complexe qui joint les homologues au cours de la prophase de la méiose.

Conceptacle Chez les champignons, l'organe où se produit la méiose et la production des spores.

Conditions permissives Conditions expérimentales dans lesquelles un mutant conditionnel présente le phénotype de l'organisme sauvage.

Conditions restrictives Conditions environnementales où un mutant conditionnel montre le phénotype muté.

Configuration cis Chez un organisme hétérozygote portant deux mutations (a_1 et a_2) dans un même gène ou dans un groupe de gènes, la disposition $a_1a_2/++$.

Configuration couplée Deux paires de gènes hétérozygotes liées dans la disposition *AB/ab*.

Configuration de répulsion Deux paires de gènes hétérozygotes liés dans la disposition *Ab/aB*.

Configuration trans Chez un hétérozygote portant deux mutations dans un gène ou un groupe de gènes, l'arrangement $a_1+/+a_2$.

Conjugaison L'union de deux cellules bactériennes pendant laquelle une partie du matériel chromosomique d'une des cellules (donneuse) est transférée vers l'autre (réceptrice).

Constitutif Toujours exprimé d'une manière non régulée (en parlant de l'expression des gènes).

Contig Un ensemble de clones ordonnés chevauchants qui couvrent une région chromosomique ou un génome.

Contrôle négatif Régulation exercée par des facteurs qui bloquent ou arrêtent la transcription.

Conversion chromatidique Mode de conversion génique révélé par l'apparition de paires de spores sœurs identiques dans une octade fungique qui présente un rapport allélique non mendélien.

Conversion génique Un processus méiotique de changement dirigé où un allèle dirige la conversion d'un autre allèle à son image.

Conversion génique polaire Un gradient de fréquence de conversion le long d'un gène.

Conversion semi-chromatidique Chez les champignons, forme de conversion génique détectée par la production de spores sœurs non identiques dans une octade caractérisée par un rapport de ségrégation d'allèles non mendélien.

Copie sélective (copy choice) Modèle du mécanisme de crossing-over suggérant que ce dernier se produit durant la division chromosomique et uniquement entre deux chromatides non-sœurs nouvellement synthétisées ; les observations expérimentales ne favorisent pas ce modèle.

Corps ou cœur Cœur du chromosome nucléaire eucaryotique duquel émergent des boucles d'ADN.

Corpuscule de Barr Masse d'hétérochromatine réagissant intensément à la coloration et correspondant à un chromosome X inactivé par la compensation de l'effet de dose.

Correction La formation (par exemple par excision suivie de réparation) d'une paire de nucléotides correctement appariés en remplacement d'une paire illégitime dans une séquence d'ADN hybride).

Coségrégation Lors d'un croisement chez *Chlamydomonas*, comportement (ségrégation) parallèle de différents marqueurs chloroplastiques dû à leur proximité sur l'ADNcp

ESCUELA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cosmide Vecteur de clonage capable soit de se répliquer de manière autonome comme un plasmide soit d'être encapsidé dans un phage.

Cotransduction Transduction simultanée de deux marqueurs génétiques bactériens.

Cotransformation Transformation simultanée de deux marqueurs génétiques bactériens.

Coupures décalées Coupures de chacune des fibres complémentaires d'un ADN double brin à quelques bases d'intervalle.

Covariance Traitement statistique utilisé pour évaluer le coefficient de corrélation entre deux variables ; la covariance est la moyenne de $(x - \overline{x})$ $(y - \overline{y})$ calculée sur toutes les paires de valeurs des variables x et y, $\overline{x}$ étant la moyenne des valeurs de x et $\overline{y}$ celle des valeurs de y.

Cristallographie par diffraction des rayons X Technique permettant de déduire la structure moléculaire d'une substance en étudiant la diffraction d'un faisceau de rayons X par un cristal de cette substance.

Croisement Accouplement délibéré de deux types parentaux d'une espèce déterminée dans le but d'effectuer une analyse génétique ou de créer de nouvelles combinaisons de marqueurs.

Croisement consanguin Croisement entre individus apparentés.

Croisement dihybride Un croisement-test entre deux individus identiques, hétérozygotes pour deux loci — par exemple, *AaBb* X *AaBb*.

Croisement intermédiaire Croisement permettant de transférer des allèles entre deux espèces sexuellement isolées ; les allèles sont d'abord transférés dans une espèce intermédiaire sexuellement compatible avec les deux autres.

Croisement interrompu Une technique utilisée pour cartographier les gènes bactériens en déterminant l'ordre dans lequel les gènes donneurs pénètrent dans les cellules réceptrices.

Croisement monohybride Se dit d'un croisement entre deux individus hétérozygotes pour les mêmes allèles d'une paire de gènes, par exemple *Aa* X *Aa*.

Croisements réciproques Paire de croisements du type génotype A ♀ X génotype B ♂ et génotype B ♀ X génotype A ♂.

Croisement-test Croisement d'un individu de génotype inconnu ou d'un hétérozygote, ou d'un hétérozygote multiple, avec un individu homozygote de référence (souche test).

Croisement-test à trois facteurs Croisement faisant intervenir un parent porteur de trois paires de gènes hétérozygotes.

Crossing-over Echange entre régions correspondantes de chromosomes homologues produit par cassure et réassociation croisées.

Crossing-over double Deux crossing-over se produisant dans une région chromosomique donnée.

Crossing-over inégal Crosssing-over entre homologues qui ne sont pas parfaitement alignés.

Crossing-over mitotique Un crossing-over résultant de l'appariement de chromosomes homologues au cours de la mitose dans une cellule diploïde.

Culture Tissu ou cellules se multipliant par division asexuée dans des conditions déterminées par l'expérimentateur.

CVS (chorionic villus sampling) Technique de prélèvement de villosités choriniques permettant d'obtenir du tissu fœtal pour l'analyse des chromosomes en vue du diagnostic prénatal des maladies héréditaires.

Cycle cellulaire La suite des événements qui se déroulent pendant la division des cellules mitotiques. Le cycle cellulaire oscille entre la mitose (phase M) et l'interphase. L'interphase peut être subdivisée, dans l'ordre, en phases G_1, S et G_2. La synthèse de l'ADN a lieu pendant la phase S. La longueur du cycle cellulaire est régulée par une option spéciale en G_1, au cours de laquelle les cellules entrent dans une phase de repos appelée G_0.

Cyclines Une famille de protéines labiles qui sont synthétisées et dégradées à des temps spécifiques dans chaque cycle cellulaire et contrôlent la progression du cycle par l'intermédiaire de leurs interactions avec des protéine kinases cyclines-dépendantes spécifiques.

Cys Cystéine (un acide aminé).

Cytidine Nucléoside dont la base est la cytosine.

Cytochromes Une famille de protéines présentes dans la membrane des mitochondries et dont la fonction principale est le transport d'électrons.

Cytogénétique Branche de la génétique fondée méthodologiquement sur la cytologie ; elle se base sur l'étude microscopique des chromosomes.

Cytopathies mitochondriales Maladies de l'homme causées par des mutations ponctuelles ou des délétions dans l'ADN mitochondrial ; soumises à l'hérédité maternelle.

Cytoplasme Constituant de la cellule localisé entre le noyau et la membrane de l'enveloppe cellulaire ; il comprend un fluide (cytosol), des organites et diverses membranes.

Cytosine Base pyrimidique qui s'apparie avec une guanine.

Cytosol Composant fluide du cytoplasme.

Cytosquelette Le système de fibres et de protéines associées qui forment l'architecture de la cellule eucaryotique.

Délétion Perte d'un segment de chromosome.

Dénaturation La séparation des deux brins de la double hélice d'ADN, ou la rupture de la structure de toute molécule complexe sans briser toutefois les liaisons covalentes dans les chaînes qui la composent.

Densité de flottaison Mesure de la tendance d'une substance à flotter dans une autre substance ; on peut identifier et séparer des macromolécules sur la base de leurs densités de flottaison respectives dans un fluide de référence ; la densité de flottaison se mesure par ultracentrifugation dans un gradient de densité (centrifugation isopycnique).

Dérive Voir **dérive génétique aléatoire.**

Dérive génétique aléatoire Changement dans la fréquence allélique résultant de ce que les gènes apparaissant dans la descendance ne correspondent pas à un échantillonnage parfaitement représentatif des gènes parentaux.

Désoxyribonucléase Voir **DNase.**

Destin cellulaire L'état différencié final vers lequel une cellule se trouve engagée.

Déterminant Molécule localisée à un certain endroit où elle oblige les cellules à adopter un destin déterminé ou un ensemble de destins apparentés.

Détermination Le processus par lequel une seule cellule donne naissance à un organisme différencié.

Détermination du sexe Le processus génétique ou environnemental par lequel le sexe d'un individu est déterminé.

Détermination phénotypique du sexe Détermination du sexe par des moyens non génétiques.

Développement Le processus par lequel une cellule unique donne lieu à un organisme différencié.

Déviation standard Racine carrée de la variance. Ecart - type.

Diagramme adaptatif Surface décrite dans un graphique à trois dimensions obtenu en reportant toutes les combinaisons possibles de fréquences d'allèles pour différents loci, portées en graphique dans un plan, et la valeur moyenne correspondant à chaque combinaison dans la troisième dimension.

Différence de caractère héréditaire Différence entre les aspects alternatifs d'un même attribut au sein d'une espèce.

Différenciation Les changements de structure et de physiologie cellulaires qui sont associés à la production des types cellulaires finals d'un organe ou d'un tissu particulier.

Dimère de thymine Une paire de thymines adjacentes pontées sur un brin d'ADN. Certains processus de réparation de telles lésions peuvent engendrer des mutations.

Dimorphisme Polymorphisme ne comportant que deux formes.

Diploïde Une cellule possédant deux jeux de chromosomes ou un individu possédant deux jeux de chromosomes dans chacune de ses cellules.

Diploïde partiel Voir **mérozygote**.

Diploïde transitoire Dans le cycle de vie de champignons et d'algues à prédominance haploïde, le stade auquel se produit la méiose.

Disque imaginal Petit groupe de cellules d'une larve d'insecte destiné à former une structure adulte complète (par exemple une patte).

Dissection génétique L'utilisation de la recombinaison et de la mutation pour analyser les différentes composantes d'une fonction biologique donnée.

Dissection mutationnelle L'étude des composantes d'une fonction biologique par l'étude de mutations affectant cette fonction.

Distribution Voir **distribution statistique**.

Distribution bimodale Distribution statistique à deux modes.

Distribution de Poisson Expression mathématique qui fournit la probabilité d'observer divers nombres de fois un événement particulier dans un échantillon, lorsque la probabilité de cet événement à chaque essai est faible mais le nombre d'essais effectués grand.

Distribution statistique Distribution des fréquences des classes différant quantitativement ou qualitativement au sein d'une population.

Ditype non-parental (DNP) Un type de tétrade contenant deux génotypes différents, tous deux recombinants.

Ditype parental (DP) Un type de tétrade comportant deux génotypes différents, tous deux de type parental.

Division cellulaire Processus au cours duquel deux cellules sont formées à partir d'une cellule mère.

Division équationnelle Une division nucléaire qui maintient le même niveau de ploïdie dans la cellule.

Division réductionnelle Division nucléaire qui produit des noyaux-fils possédant la moitié des centromères du noyau parental.

DNase (désoxyribonucléase) Enzyme dégradant l'ADN en nucléosides.

DNP Voir **ditype non parental**.

Dogme central Hypothèse selon laquelle le flux de l'information génétique est transmis de l'ADN vers l'ARN et de l'ARN vers les protéines. Bien que souffrant certaines exceptions (rétrovirus), cette règle est respectée dans la plupart des cas.

Dominance incomplète Situation dans laquelle un hétérozygote se caractérise quantitativement par un phénotype intermédiaire entre les phénotypes homozygotes respectifs.

Dominance par gain de fonction Une mutation dont la dominance est causée par l'altération de la structure ou du profil d'expression du produit d'un gène plutôt que par la simple perte de l'activité de ce gène.

Dosage de gènes Le nombre de copies d'un gène donné dans un génome.

Dose génique Voir **dosage de gènes**.

Double hélice La structure de l'ADN proposée par Watson et Crick, formée de deux hélices enlacées jointes par des liaisons hydrogène entre bases appariées.

Double infection Infection d'une bactérie par deux phages génétiquement différents.

DP Voir **ditype parental**.

Duplication Désigne la présence de plus d'une copie d'un segment de chromosome par garniture chromosomique.

Duplication en tandem Segments de chromosomes adjacents et identiques.

Dyade Une paire de chromatides-sœurs associées par le centromère comme dans la première phase de la méiose.

Dysgenèse hybride Un ensemble d'effets (stérilité, mutation, bris de chromosomes et recombinaison chez le mâle) observés dans la descendance hybride de croisements entre certaines souches de laboratoire et les souches sauvages chez la drosophile.

Dystrophie musculaire de Duchenne Une maladie létale des muscles, chez l'homme, qui est associée à une mutation dans un énorme gène codant pour la dystrophine, une protéine musculaire ; se transmet comme un phénotype récessif lié au chromosome X.

Ecart de sélection Différence entre la valeur moyenne d'une population et celle des individus sélectionnés comme parents de la génération suivante.

Ecart type Racine carrée de la variance.

Ecdysone Une hormone de mue chez les insectes.

Echange entre chromatides-sœurs (ECS) Evénement de «crossing-over» qui se produit entre chromatides-sœurs à la méiose ou à la mitose. Il se détecte sur les chromosomes arlequin.

Effet de position Phénomène invoqué pour décrire une situation où l'expression d'un gène est influencée par sa position dans le génome.

Effet maternel L'influence du milieu constitué par les tissus maternels sur le phénotype de la descendance.

Electrophorèse Une technique de séparation des éléments d'un mélange de molécules (protéines, ADN, ARN) par migration dans un gel soumis à un champ électrique.

Electrophorèse sur gel en champs alternés (pulsed field gel electrophoresis) Technique électrophorétique dans laquelle le gel est soumis alternativement à des champs électriques d'orientations différentes, permettant à des fragments même très grands d'ADN de zigzaguer à travers le gel et d'être séparés efficacement à partir de mélanges.

Elément de contrôle Elément génétique mobile pouvant produire des mutants instables dans un gène cible ; on distingue des éléments dits régulateurs d'autres dits récepteurs.

Elément de réponse aux hormones (ERH) Dans le cas d'une hormone qui agit en se liant à un récepteur jouant le rôle de facteur de transcription, un ERH est une séquence régulatrice opérant en *cis* qui sert de site de liaison à l'ADN du complexe hormone -récepteur.

Elément génétique mobile ou transposable Un terme général pour toute unité génétique qui peut s'insérer dans un chromosome, s'en exciser et changer de localisation. Inclut les séquences d'insertion (ou éléments IS), les transposons, certains phages et les éléments de contrôle.

Elément IS («insertion sequence») Un fragment mobile d'ADN bactérien (long de plusieurs centaines de paires de nucléotides) capable d'inactiver un gène lorsqu'il s'y insère.

Elément P Un élément transposable de *Drosophila* qui a été utilisé comme outil pour la mutagénèse par insertion et la transformation des lignées germinales.

Elément récepteur Elément de contrôle qui peut s'insérer dans un gène (en y causant une mutation) et peut aussi s'exciser (rendant donc la mutation instable) ; ces deux fonctions ne sont pas autonomes et sont sous le contrôle d'un élément régulateur.

Elément régulateur Voir **élément récepteur**.

Empilement Superposition des bases azotées au centre de la double hélice d'ADN.

Empreinte digitale de l'ADN Le profil de bandes autoradiographiques spécifique d'un individu qui est obtenu lorsque l'ADN est digéré à l'aide d'une enzyme de restriction qui le clive en dehors d'une famille de VNTR (voir VNTR) et qu'un transfert de Southern du gel d'électrophorèse est effectué et criblé au moyen d'une sonde spécifique du VNTR.

Empreinte digitale ou «fingerprint» La répartition typique des taches produite par l'électrophorèse des fragments polypeptidiques obtenus après traitement d'une protéine par une enzyme protéolytique.

ACU INSTITUT CENTRAL LIBRARY

Empreinte parentale Un phénomène épigénétique dans lequel l'activité d'un gène dépend de ce qu'il est hérité du père ou de la mère. Certains gènes reçoivent une empreinte maternelle, d'autres une empreinte paternelle.

Endogénote Voir **mérozygote.**

Endonucléase Une enzyme qui clive la liaison phosphodiester au sein d'une chaîne de nucléotides.

Endopolyploïdie L'augmentation du nombre de jeux chromosomiques due à un doublement de chromosomes non-suivi d'une division cellulaire.

Endosperme Tissu triploïde de la graine formé par fusion de deux cellules polaires haploïdes femelles et du noyau haploïde du gamète mâle.

Enlacement Alignement spontané de deux simples brins d'ADN complémentaires pour former une double hélice.

Enrichissement sur filtre Une technique permettant de récupérer des auxotrophes chez les champignons filamenteux.

Entaillage (nicking) Coupure par une nucléase à un site spécifique du squelette sucre-phosphate d'un des brins de l'ADN.

Environnement (milieu) La combinaison de tous les facteurs externes affectant l'expression et la structure du génome.

Enzyme Une protéine qui fonctionne comme catalyseur d'une réaction.

Enzyme de restriction Endonucléase qui reconnaît pour cible une séquence nucléotidique spécifique dans l'ADN et scinde la chaîne d'ADN à cet endroit ; une grande variété de ces enzymes est connue et ils sont utilisés de manière intensive en ingénierie génétique.

Episome Un élément génétique bactérien qui peut se répliquer librement dans le cytoplasme ou s'insérer dans le chromosome bactérien et se répliquer avec lui.

Epissage ou excision-épissage Réaction qui rejoint les exons après l'excision des introns.

Epissage alternatif Le processus par lequel des ARNm différents sont produits à partir du même transcrit primaire suite à des variations dans le trajet d'épissage de ce transcrit. Les «isoformes» multiples de l'ARNm peuvent être produites dans la même cellule, ou dans des cellules différentes utilisant des trajets d'épissage spécifiques des tissus. Si les exons alternatifs sont situés dans les cadres de lecture ouverts des isoformes d'ARNm, des protéines différentes seront produits à partir des ARNm alternatifs.

Epistasie Une situation dans laquelle l'expression phénotypique d'un génotype à un locus donné dépend du génotype à un autre locus.

Epitope La portion d'une molécule d'antigène qui est reconnue par une immunoglobuline spécifique.

Equilibre de Hardy-Weinberg La distribution stable de la fréquence des génotypes *AA*, *Aa* et *aa*, dans les rapports respectifs p^2, $2pq$ et q^2 (où p et q représentent la fréquence des allèles *A* et *a*), obtenue suite à des croisements se produisant au hasard en l'absence de mutation, migration, sélection naturelle ou dérive fortuite.

Etat de base Le stade de développement d'une cellule (ou d'un groupe de cellules) en l'absence d'activation par un régulateur du développement.

Etat de carence (default state) L'état de développement où une cellule (ou un groupe de cellules) se trouve maintenue en l'absence d'activation d'un dispositif régulateur du développement

Ethidium Une molécule qui peut s'intercaler entre les bases de la double hélice de l'ADN lorsque celle-ci est soumise à une torsion.

Etiquetage (tagging) L'utilisation d'un segment d'ADN étranger ou d'un transposon pour étiqueter un gène de manière à pouvoir aisément l'identifier dans une banque.

Eucaryote Un organisme composé de cellules eucaryotes.

Euchromatine Une région du chromosome qui se colore normalement ; est probablement associée à des gènes fonctionnels.

Eugénique Contrôle de l'amélioration de l'espèce humaine basé sur la notion de génotypes favorables et défavorables.

Euploïde Une cellule caractérisée par une garniture (jeu) chromosomique complète ; désigne aussi un individu formé de telles cellules.

Evénement mutationnel Le fait qu'une mutation survienne (dans le temps et dans l'espace).

Exconjuguant Une cellule bactérienne femelle, issue d'une conjugaison avec une cellule mâle et contenant un fragment d'ADN mâle.

Exogénote Voir **mérozygote.**

Exon Toute portion de la séquence codante d'un gène ne faisant pas partie d'un intron ; les exons conduisent à la synthèse d'un ARN retrouvé dans le messager mature et sont donc finalement traduits sous forme de protéines.

Exonucléase Une enzyme clivant les nucléotides un par un à l'extrémité d'une chaîne polynucléotidique.

Expérience de marquage court avec chasse (pulse-chase) Expérience dans laquelle les cellules sont cultivées pendant une brève période (pulse) dans un milieu radioactif puis transférées dans un milieu non radioactif pour un temps plus long (chase).

Expression ectopique L'expression d'un gène dans un tissu où normalement il n'est pas exprimé ; cette expression ectopique peut être causée par la juxtaposition d'un nouvel amplificateur à un gène.

Expression génétique tissu-spécifique Chez un eucaryote supérieur, expression d'un gène dans un ensemble spécifique et reproductible de tissus et de cellules au cours du développement.

Expressivité Traduit le degré d'expression phénotypique d'un génotype particulier.

Extension de triplets Extension d'une répétition de triplets d'un nombre relativement faible à un nombre élevé de copies, qui est responsable d'un certain nombre de maladies génétiques telles que le syndrome de l'X fragile.

Extrait S9 Surnageant préparé à partir de foie et utilisé dans le test d'Ames pour activer ou inactiver les substances potentiellement mutagènes testées.

Extrémités cohésives ou bouts collants Extrémités de fragments d'ADN clivés de manière décalée et capables de s'associer par des liaisons hydrogène avec les séquences complémentaires d'autres fragments obtenus de manière similaire.

FACS (pour **fluorescence-activated chromosome sorting**) Triage des chromosomes par activation de fluorescence. L'utilisation des signaux de fluorescence spécifiques provenant de chromosomes colorés contenus dans des gouttelettes d'aérosol pour activer des plaques déflectrices qui les répartissent selon leurs types dans des tubes collecteurs différents.

Facteur de fertilité (facteur F) Un épisome bactérien dont la présence confère le caractère mâle.

Facteur de transcription Une protéine qui se lie à un élément régulateur opérant en *cis* (un amplificateur, par exemple) et, de cette façon, affecte directement ou indirectement l'initiation de la transcription.

Facteur F Voir **facteur de fertilité.**

Facteur F' Un facteur de fertilité auquel une portion du chromosome bactérien a été incorporée.

Facteurs de croissance Molécules signaux paracrines, habituellement des polypeptides sécrétés, qui induisent la division cellulaire dans les cellules qui les reçoivent.

Facteurs multiples (hypothèse des) Hypothèse émise pour expliquer une variation quantitative par l'interaction d'un grand nombre de gènes (polygènes) aux effets faibles et cumulatifs sur le caractère considéré.

Famille de gènes Un ensemble de gènes dérivés d'un même gène ancestral.

Fécondation croisée forcée (exogamie) Absence délibérée de croisements entre individus apparentés.

Filaments intermédiaires Une classe hétérogène d'éléments cytosquelet-

tiques caractérisés par un diamètre intermédiaire plus grand que celui des microfilaments et plus petit que celui des microtubules.

FISH (Hybridation fluorescente in situ) Hybridation in situ à l'aide d'une sonde couplée à une molécule fluorescente.

Fission binaire Division d'une cellule mère en deux cellules filles de tailles approximativement égales.

Flottement («wobble») La capacité qu'ont certaines bases à la troisième position d'un anticodon dans un ARNt de former des liaisons hydrogène de diverses manières, rendant possible l'alignement avec plusieurs codons différents.

Fluctuations perturbant le cours du développement (fluctuations ontogéniques) L'influence de processus moléculaires fortuits sur le développement.

fMet Voir **Formylméthionine.**

Fonction cartographique Une formule exprimant la relation entre la distance sur une carte génétique et la fréquence de recombinaison.

Fonction de distribution Un graphique où des mesures quantitatives d'un caractère sont associées à sa fréquence d'apparition.

Formation de plans d'ébauche Le processus de développement qui conduit aux formes et structures complexes des organismes supérieurs.

Formylméthionine(fMet) Un acide aminé spécialisé en ce qu'il est le premier à être incorporé dans la chaîne polypeptidique lors de la synthèse des protéines.

Fourche de réplication Point où les deux brins d'ADN sont séparés pour permettre la réplication de chaque brin

FR Voir **fréquence de recombinaison.**

Fréquence allélique Mesure de la présence d'un allèle dans une population. La proportion au sein d'une population de tous les allèles d'un gène qui sont d'un type spécifique.

Fréquence de recombinaison (FR) Proportion (ou pourcentage) de cellules ou d'individus recombinants.

Fréquence de mutation La fréquence des mutants dans une population.

Fréquence génique Voir **fréquence allélique.**

Fuseau Ensemble de fibres microtubulaires qui déplace les chromosomes eucaryotiques durant la division.

Fusion de gènes La jonction accidentelle des ADN de deux gènes se produisant au cours d'une translocation. Les fusions de gènes peuvent donner lieu à la formation de protéines hybrides ou à une fausse régulation de la transcription d'un gène par les éléments régulateurs opérant en *cis* (promoteurs, amplificateurs) d'un autre gène.

Fusion de l'ADN Voir dénaturation de l'ADN.

G Guanine ou guanosine.

Gamète Une cellule haploïde spécialisée dont la fusion avec un gamète de sexe ou de signe opposé conduit à la formation d'un zygote diploïde ; chez les mammifères, un ovocyte ou un spermatozoïde.

Gamétophyte La phase du cycle de vie d'une plante pendant laquelle sont produits les gamètes haploïdes ; prédominante et indépendante chez certaines espèces, réduite ou parasitaire chez d'autres.

Gastrulation Stade de l'embryogénèse précoce où apparaissent les premiers mouvements et invaginations de la couche de cellules, en général immédiatement après le stade blastula (ou blastoderme).

Gène L'unité structurale et fonctionnelle de l'hérédité, porteuse de l'information d'une génération à l'autre ; un segment d'ADN comportant une région transcrite et une séquence rendant le contrôle de la transcription possible.

Gène candidat Un gène séquencé mais de fonction inconnue qui, en fonction de sa position sur le chromosome ou en raison d'une autre propriété, devient un candidat à une fonction particulière comme la cause d'une maladie.

Gène cardinal Les gènes de formation du plan d'ébauche de *Drosophila* qui répondent zygotiquement aux gradients d'information de positionnement antérieur-postérieur et dorso-ventral produits par les gènes de formation du plan d'ébauche exprimés maternellement.

Gène de la règle d'appariement (pair-rule) Chez *Drosophila*, un membre d'une classe de gènes exprimés zygotiquement qui agissent à un stade intermédiaire dans le processus d'établissement du nombre correct de segments du corps. Les mutants pair-rule possèdent la moitié du nombre normal de segments, en raison de la perte d'un segment sur deux.

Gène de polarité segmentaire Chez *Drosophila*, un membre de la classe des gènes qui contribuent aux aspects finals de l'établissement du nombre correct de segments. Les mutations de polarité segmentaire provoquent la perte d'une portion comparable de chaque segment du corps.

Gène de transformation virale Un gène du génome viral qui peut induire une prolifération anormale des cellules en culture et, de manière similaire, induire des tumeurs dans des animaux entiers infectés.

Gène exprimé maternellement Un gène qui contribue au phénotype de la descendance sur la base de son expression chez la mère.

Gène hémizygote Un gène présent en une seule copie chez un organisme diploïde — par exemple les gènes liés au sexe chez un mammifère mâle.

Gene knock-out Voir **Interruption génique.**

Gène létal Un gène dont l'expression cause la mort de l'individu qui l'exprime.

Gène modificateur Un gène qui affecte l'expression phénotypique d'un autre gène.

Gène opérant zygotiquement Un gène dont le produit est exprimé uniquement dans le zygote et n'est pas inclus dans la contribution maternelle à l'ovocyte.

Gène rapporteur Gène dont l'expression phénotypique est aisée à suivre ; utilisé pour étudier l'activité d'un promoteur à différents moments ou stades du développement, au moyen d'ADN recombinant où le gène rapporteur est fusionné à une région promoteur intéressante.

Gène semi-létal Gène dont la présence cause la mort d'une partie des individus qui l'expriment.

Gène structural ou de structure Gène qui code pour la séquence d'acides aminés d'une protéine.

Gène suppresseur de tumeur Gène codant pour une protéine qui supprime la formation d'une tumeur.

Génération F_1 La première génération hybride obtenue en croisant deux lignées parentales.

Génération F_2 La génération obtenue en laissant s'autoféconder les individus F_1 ou en les croisant entre eux.

Générations filiales Générations successives obtenues suite à une série de croisements, à partir de deux parents donnés (la génération P) et à l'autofécondation ou la fécondation croisée des descendants de chaque nouvelle génération (F_1, F_2,...).

Gènes d'histocompatibilité Les gènes qui codent pour les antigènes d'histocompatibilité.

Gènes dupliqués Deux paires d'allèles identiques présents chez un individu diploïde.

Gènes en perles de collier Hypothèse qui s'est avérée incorrecte selon laquelle les gènes seraient arrangés sur le chromosome comme des perles sur le fil d'un collier et seraient indivisibles en unités de mutation ou de recombinaison plus petites.

Gènes lacunaires (gap) Chez *Drosophila*, la classe de gènes cardinaux qui sont activés dans le zygote en réponse aux gradients antéro-postérieur d'information de positionnement. Par la régulation des gènes de la règle d'appariement (pair-rule) et homéotiques, les profils d'expression des produits

des divers gènes gap déterminent le nombre correct et les types de segments du corps. Les mutations des gènes gap provoquent la perte de plusieurs segments adjacents (mutations lacunaires).

Gènes paralogues Deux gènes ou groupes de gènes localisés à des endroits différents du génome d'un même organisme et présentant des similitudes structurales qui indiquent qu'elles dérivent d'un gène ancestral commun.

Gènes régulateurs Gènes impliqués dans la mise en route ou l'arrêt de la transcription des gènes structuraux.

Génétique (1) L'étude des gènes d'après leurs variations. (2) L'étude de l'hérédité.

Génétique de la transmission Etude des mécanismes impliqués dans le passage des gènes d'une génération à la suivante.

Génétique inverse Le processus génétique qui, partant d'un segment d'ADN cloné ou de la séquence d'une protéine, consiste à y ménager des mutations (par mutagénèse dirigée) et à réintroduire ces segments mutés dans le génome afin d'étudier leurs fonctions.

Génétique moléculaire L'étude des processus moléculaires qui expliquent la structure et la fonction des gènes.

Génétique somatique Génétique asexuée qui fait intervenir des mutations somatiques, leur recombinaison et leur ségrégation après fusion *in vitro* de deux cellules génétiquement distinctes.

Génome Désigne l'ensemble du matériel génétique présent dans un jeu de chromosomes.

Génomique La branche de la génétique qui traite du clonage et de la caractérisation moléculaire des génomes entiers.

Génotype La composition allélique d'une cellule particulière ; fait référence à l'ensemble des gènes de la cellule ou, plus souvent, à un gène ou un ensemble de gènes.

Gln Glutamine (un acide aminé).

Glu Glutamate (un acide aminé).

Gly Glycine (un acide aminé).

Gradient Changement quantitatif graduel d'une propriété.

Granules polaires Granules localisés à l'extrémité antérieure du cytoplasme d'un œuf de *Drosophila*.

Groupe d'équivalence Un groupe de cellules immatures qui possèdent toutes le même potentiel de développement. Souvent les différentes cellules d'un groupe d'équivalence finissent par adopter des destins différents les uns des autres.

Groupe de liaison Un groupe de gènes liés ; un chromosome.

Guanine Base purique s'associant avec la cytosine.

Guanosine Le nucléoside qui comporte la guanine comme base.

Gynandromorphe Un individu qui est une mosaïque de structures mâles et femelles. La cause sous-jacente est souvent le mosaïcisme des chromosomes sexuels, de sorte que certaines cellules sont femelles par leur composition chromosomique tandis que d'autres sont mâles par cette composition.

Haploïde Une cellule ne possédant qu'un jeu chromosomique, ou un organisme composé de cellules de ce type.

Haploïdisation Obtention d'un haploïde par perte graduelle de chromosomes chez le diploïde.

Hémoglobine (Hb) Protéine sanguine transportant l'oxygène dans le sang chez beaucoup d'animaux.

Hémophilie Une maladie humaine caractérisée par un défaut de coagulation du sang causé par une mutation dans un gène codant pour un facteur de coagulation ; se transmet comme un phénotype récessif lié au chromosome X.

Hérédité La similarité biologique des parents avec leur descendance.

Hérédité cytoplasmique Transmission de traits spécifiés par le génome d'organites cytoplasmiques.

Hérédité en zig-zag Transmission d'un gène d'un parent mâle à un enfant femelle puis à un petit-enfant mâle - par exemple, les cas d'hérédité liée au sexe (marqueurs génétiques sur le chromosome X).

Hérédité épigénétique Processus par lequel des modifications héréditaires de la fonction des gènes qui ne sont pas dues à des modifications de la séquence de bases de l'ADN se produisent. Des exemples d'hérédité épigénétique sont les paramutations, l'inactivation des chromosomes X et l'empreinte parentale.

Hérédité maternelle Un type d'hérédité uniparentale dans lequel toute la descendance possède le génotype et le phénotype du parent femelle.

Hérédité matrocline Hérédité où toute la descendance possède le phénotype déterminé par le noyau maternel.

Hérédité monoparentale Transmission de certains phénotypes d'un parent à l'ensemble de la descendance, généralement produite par des gènes d'organite.

Hérédité par mélange Théorie aujourd'hui caduque de l'hérédité selon laquelle les caractéristiques d'un individu résulteraient du mélange dans certaines proportions des influences parentales.

Hérédité particulaire Modèle qui propose que l'information génétique soit transmise d'une génération à la suivante sous la forme d'unités discrètes («particules»), de telle sorte que les caractères de la descendance ne résultent pas du simple mélange des traits des parents (comparer à **l'hérédité par mélange**).

Hérédité patrocline Hérédité dans laquelle tous les descendants possèdent le phénotype déterminé par le noyau du père.

Héritabilité au sens étroit ou héritabilité restreinte (h^2) La proportion de la variance phénotypique pouvant être attribuée à la variance génétique additive.

Héritabilité large (H^2) Contribution de la variance génétique à la variance phénotypique totale d'une population.

Héritabilité au sens large Voir **héritabilité large**.

Héritabilité réalisée Rapport de la réponse à la sélection en une génération à la valeur de la sélection différentielle des parents.

Hermaphrodite (1) Une espèce végétale où les organes mâles et femelles appartiennent à la même fleur d'un seul individu (comparez à une plante monoïque). (2) Un animal possédant à la fois des organes sexuels mâle et femelle.

Hétérocaryon Une cellule comportant deux types de noyaux différents au sein d'un même cytoplasme.

Hétérochromatine Régions chromosomiques condensées et intensément colorées, considérées comme génétiquement inertes.

Hétérochromatine constitutive Région toujours présente sous forme d'hétérochromatine dans les deux homologues d'un chromosome.

Hétérochromatine facultative Hétérochromatine localisée à des endroits qui sont composés d'euchromatine chez d'autres individus de la même espèce voire même dans l'homologue d'une paire de chromosomes.

Hétéroduplex Une double hélice d'ADN formée par l'association de simples brins de sources différentes ; s'il existe des différences de structure entre les brins, l'hétéroduplex peut montrer des anomalies comme des boucles ou des oeillets.

Hétéroplasmon Une cellule contenant un mélange de cytoplasmes génétiquement différents et, en général, de mitochondries et de chloroplastes différents.

Hétérozygote Un individu ayant une paire de gènes hétérozygotes.

Hétérozygote cytoplasmique Cellule contenant deux types génétiquement distincts d'un organite spécifique.

Hétérozygotie Une mesure de la variation génétique dans une population,

COLLEGE CENTRAL LIBRARY

par rapport à un locus ; établie comme la fréquence d'hétérozygotes à ce locus.

Hexaploïde Une cellule comportant six jeux chromosomiques ou un organisme formé de cellules de ce type.

Himalayen Un phénotype de la robe des mammifères dépendant de la température et consistant généralement en une robe blanche ne comportant de pigments qu'aux extrémités froides des oreilles, des pattes et de la queue.

His Histidine (un acide aminé).

Histogramme de fréquences Représentation graphique des fréquences de classes.

Histone Un type de protéines basiques qui forment les unités autour desquelles l'ADN s'enroule dans les nucléosomes des chromosomes eucaryotiques.

Homéoboîtes (Boîtes homéotiques) Courtes séquences homologues (≈ 180 paires de bases) identifiées dans la partie 3' de l'exon des gènes homéotiques de *Drosophila*. Des séquences similaires ont été trouvées chez d'autre organismes. Impliquées dans la fixation de protéines à l'ADN au cours de la régulation des gènes.

Homéodomaine Une famille de séquences hautement conservées d'une soixantaine d'acides aminés présentes chez un grand nombre de facteurs de transcription qui forment des structures en hélice-tournant-hélice impliquées dans la liaison à des séquences spécifiques de l'ADN.

Homéosie Le remplacement d'une partie du corps par une autre. L'homéosie peut être provoquée soit par des facteurs environnementaux menant à des anomalies du développement, soit par des mutations.

Homologue Membre d'une paire de chromosomes homologues.

Homozygote Un individu possédant une paire de gènes homozygotes.

Hormone Une molécule sécrétée dazns le système circulatoire par un organe endocrine et qui agit comme une molécule signal à longue distance en activant des récepteurs situés sur ou dans les cellules cibles.

Hormone stéroïde Une classe d'hormones synthétisées par des glandes du système endocrine qui, en raison de leur nature non polaire, sont capables de traverser directement la membrane cytoplasmique des cellules. Les hormones stéroïdes agissent en se liant à et en activant des facteurs de transcription appelés récepteurs d'hormone stéroïde.

Hybridation *in situ* Moyen d'identifier l'emplacement d'un gène basé sur l'emploi de sondes radioactives spécifiques ; le gène est localisé sur le chromosome après hybridation avec la sonde et autoradiographie.

Hybridation *in situ* des ARN Une technique utilisée pour identifier le profil spatial d'expression d'un transcrit particulier (en général un ARNm). Dans cette technique, une sonde d'ADN est marquée, par marquage radioactif ou par liaison chimique d'une enzyme capable de convertir un substrat en un colorant visible. Un échantillon de tissu ou un organisme entier est immergé dans une solution d'ADN monocaténaire marqué dans des conditions qui permettent l'hybridation de l'ADN avec les séquences d'ARN complémentaires de la cellule ; l'ADN qui ne s'est pas hybridé est ensuite éliminé. La radioactivité de la sonde est détectée par autoradiographie. Les sondes marquées au moyen d'une enzyme sont trempées dans une solution de substrat ; le colorant se développe aux sites où le transcrit recherché est synthétisé.

Hybride (1) Un hétérozygote. (2) Les descendants de tout croisement impliquant des parents de génotypes différents.

Hybrider (1) Produire un hybride en réalisant un croisement. (2) Associer deux brins d'acides nucléiques provenant de sources différentes.

Hybrides irradiés Un type d'hybrides cellulaires homme-souris dont les chromosomes humains ont été fragmentés par irradiation afin d'identifier les marqueurs qui sont transmis ensemble et sont donc liés.

Hydroxyapatite Une forme de phosphate de calcium qui s'associe avec de l'ADN à double brin.

Hyperactivation de X Chez *Drosophila*, le processus par lequel les gènes de structure du chromosome X unique d'un mâle sont transcrits à une fréquence égale à la somme des fréquences de transcription des gènes des deux chromosomes X d'une femelle.

Hyperploïde Aneuploïde contenant un petit nombre de chromosomes surnuméraires.

Hyphe Une structure filamenteuse composée de cellules attachées bout à bout et formant le tissu principal chez de nombreuses espèces de champignons.

Hypoploïde Aneuploïde auquel manque un petit nombre de chromosomes.

Hypothèse des coups multiples L'hypothèse selon laquelle une cellule isolée doit subir une série de mutations pour devenir maligne ou cancéreuse.

Hypothèse des facteurs multiples Une hypothèse pour expliquer la variation quantitative basée sur l'interaction d'un grand nombre de gènes (polygènes), chacun n'ayant q'un petit effet additif sur le caractère considéré.

Ile Isoleucine (un acide aminé).

Imago Un insect adulte

Immunoglobuline (Ig) Voir **anticorps.**

Immunohistochimie L'utilisation d'anticorps ou d'antisérum comme outils pour déterminer la distribution des protéines dans un tissu ou dans un organisme. Un anticorps (ou un mélange d'anticorps) qui se lie à une protéine spécifique est étiqueté à l'aide d'une enzyme qui convertit un substrat en un produit coloré visible. L'anticorps étiqueté est incubé avec le tissu, l'anticorps non lié est éliminé par lavage et le substrat de l'enzyme est ajouté, révélant la localisation de la protéine (c'est-à-dire de l'antigène).

Inactivation d'un gène spécifique. Voir **interruption génique.**

Inactivation du chromosome X Dans les embryons femelles de mammifères, l'inactivation aléatoire précoce des gènes localisés sur un des X qui conduit au mosaïcisme des fonctions codées par des gènes liés à des chromosomes X hétérozygotes (*voir* **compensation de la dose génique** et **corpuscule de Barr**).

Inducteur Un agent extérieur qui déclenche la transcription d'un opéron.

Induction Levée de la répression d'un gène ou d'un groupe de gènes soumis à un contrôle négatif.

Induction zygotique Production soudaine d'un phage par un chromosome Hfr lorsque le prophage pénètre dans une cellule F⁻ non lysogène.

Information de position Le processus par lequel des indices chimiques qui déterminent le destin des cellules sont établis le long d'un axe géographique dans un embryon ou dans un primordium de tissu.

Inosine Une base rare, importante pour le flottement (wobble) de certains anticodons d'ARN de transfert.

In situ «En place» ; voir **hybridation *in situ*.**

Intégration ectopique Dans un organisme transgénique, l'insertion d'un gène introduit à un site différent de son site normal.

Interaction génique L'implication de plusieurs gènes différents dans l'expression d'un phénotype.

Interaction inductive Interaction de deux groupes de cellules dans laquelle un signal issu d'un groupe de cellules provoque un changement de l'état de développement (ou du destin) de l'autre..

Interaction ligand-récepteur L'interaction d'une molécule (en général d'origine extracellulaire) avec une protéine localisée à la surface ou à l'intérieur d'une cellule cible. Un exemple d'interaction ligand-récepteur est celui des hormones stéroïdes avec leurs récepteurs cytoplasmiques ou nucléaires. Un autre exemple concerne les ligands polypeptidiques sécrétés et les récepteurs transmembranaires.

Interférence Une mesure de l'interférence dans la formation des crossing-over ; calculée en soustrayant le coefficient de coïncidence de 1.

Interférence chromatidique Situation particulière dans laquelle l'établissement d'un crossing-over entre deux chromatides non-sœurs modifie la

probabilité d'établissement d'un autre crossing-over entre ces deux chromatides durant la même méiose.

Interphase Le stade du cycle cellulaire entre les divisions nucléaires au cours duquel les chromosomes sont étirés et fonctionnels.

Interruption génique L'introduction d'une mutation nulle dans un gène par la création d'une altération dans la séquence d'ADN du gène cloné qui est ensuite introduit dans le génome par recombinaison homologue et remplacement de l'allèle normal. Synonymes : Inactivation d'un gène spécifique ; gene knock-out.

Intron Un segment de fonction essentiellement inconnue dans un gène qui initialement est transcrit mais n'est pas retrouvé dans l'ARN messager fonctionnel.

Inversion Une mutation chromosomique impliquant l'excision d'un segment chromosomique, sa rotation de 180 degrés et sa réinsertion à la même place.

Inversion de sexe Un syndrome connu chez l'homme et chez la souris où des individus XX sur le plan chromosomique se développent comme des mâles. On sait aujourd'hui que, dans certains cas, l'inversion de sexe est due à la translocation de la région du chromosome Y responsable de la formation des testicules vers l'extrémité du chromosome X.

Inversion paracentrique Inversion qui n'implique pas le centromère.

Inversion péricentrique Inversion qui implique le centromère.

In vitro Dans un contexte expérimental extérieur à l'organisme (littéralement, «dans du verre»).

In vivo Dans une cellule ou un organisme vivant.

IR Voir **Séquence répétée inversée.**

IS Voir **Elément IS.**

Isotope L'une des formes possibles d'un atome ayant toutes le même nombre atomique mais des masses atomiques différentes.

Jeu de chromosomes Ensemble des différents chromosomes qui portent l'information génétique de base (nombre haploïde) d'une espèce déterminée.

Kinétochore Voir **centromère**

Knock-out Voir **inactivation (d'un gène).**

Lésion Une région endommagée d'un gène (un site mutationnel), d'un chromosome ou d'une protéine.

Leu Leucine (un acide aminé).

Lexique du code (génétique) La liste des 64 codons et leurs traductions en termes d'acides aminés.

Liaison L'association de gènes sur le même chromosome.

Liaison à l'X Présence d'un gène sur le chromosome X et non sur le chromosome Y.

Liaison à l'X et à l'Y Présence d'un gène sur les chromosomes X et Y (rare).

Liaison à l'Y Présence d'un gène sur le chromosome Y et non sur le chromosome X (rare).

Liaison au sexe Localisation d'un gène sur un chromosome sexuel.

Liaison hydrogène Une liaison faible reposant sur la mise en commun d'un électron entre un atome d'hydrogène et un autre atome ; les liaisons hydrogène sont importantes pour la spécificité de l'appariement des bases dans les acides nucléiques et pour déterminer la conformation des protéines.

Liaison peptidique Liaison unissant deux acides aminés.

Liaison phosphodiester Liaison entre un groupement phosphate et deux sucres ; de telles liaisons forment le squelette sucre-phosphate de l'ADN.

Ligase Une enzyme qui peut rétablir une liaison phosphodiester rompue dans un acide nucléique.

Lignée Un groupe d'organismes diploïdes ou polyploïdes donnant naissance à des descendants identiques à eux-mêmes et que l'on peut distinguer d'autres individus de la même espèce par quelque phénotype et génotype unique.

Lignée cellulaire Clone de cellules issues d'une cellule mère par division cellulaire asexuée.

Lignée germinale Lignée cellulaire dont dérivent les gamètes dans un eucaryote à tissus multiples.

Lignée ou souche pure Groupe d'individus identiques qui produisent toujours des descendants de même phénotype après croisement.

LINE (ou **long interspersed element**) Long motif d'ADN répété et dispersé dans tout le génome eucaryotique.

Locus (pluriel : **loci**) Voir **locus génique.**

Locus génique L'emplacement spécifique d'un chromosome où se trouve localisé un gène donné.

Lois de Mendel (première loi) Les deux membres d'une paire de gènes ségrègent au cours de la méiose ; chaque gamète a une probabilité égale de recueillir l'un ou l'autre membre de cette paire de gènes.

Lois de Mendel (deuxième loi) La loi de l'assortiment indépendant : des paires de gènes ségrégeants non liés ou éloignés l'un de l'autre s'assortissent indépendamment lors de la méiose.

Lymphome de Burkit Cancer du système lymphatique qui se manifeste par des tumeurs aux mâchoires ; il est souvent lié à une translocation plaçant un oncogène spécifique à proximité d'un nouvel élément régulateur.

Lys Lysine (un acide aminé).

Lyse La rupture et la mort d'une cellule bactérienne lors de la libération des bactériophages qui s'y sont multipliés.

Lysogène Voir **bactérie lysogène.**

Macromolécule Un polymère de grande taille comme l'ADN, une protéine ou un polysaccharide.

Maladie de Huntington Une maladie létale de l'homme qui se manifeste par une dégénérescence des nerfs chez les personnes agées. Se transmet comme un phénotype autosomique dominant ; les nouvelles mutations sont rares.

Mankx Phénotype d'absence de queue chez les chats ; causé par une mutation autosomique dominante qui est létale à l'état homozygote.

Marche sur le chromosome Une méthode de dissection de larges portions d'ADN dans laquelle un fragment d'ADN cloné, en général eucaryotique, est utilisé pour rechercher parmi les clones d'ADN recombinant de la même banque d'autres clones comportant des séquences voisines.

Marqueurs génétiques Formes alléliques utilisées comme sondes expérimentales pour suivre la trace d'un individu, d'un tissu, d'une cellule, d'un noyau, d'un chromosome ou d'un gène.

Matrice Un «moule» moléculaire qui détermine la structure ou la séquence d'une autre molécule ; la séquence nucléotidique d'un brin d'ADN, par exemple, sert de matrice qui contrôle la séquence nucléotidique de l'ARN au cours de la transcription.

Méiocyte Cellule qui subit la méiose.

Méiose Deux divisions nucléaires successives (avec divisions cellulaires correspondantes) qui produisent des gamètes (chez les animaux) ou des spores sexuées (chez les plantes et les champignons) possédant la moitié du matériel génétique de la cellule d'origine.

Méiospore Cellule qui est l'un des produits de la méiose chez les plantes.

Mérozygote Une cellule d'*E. coli* partiellement diploïde contenant un chromosome complet (l'endogénote) et un fragment (l'exogénote).

COLLAS/CENTRAL LIBRARY

Met Méthionine (un acide aminé).

Métabolisme Les réactions chimiques qui se produisent dans une cellule vivante.

Métamères Unités segmentales répétées des animaux supérieurs.

Métaphase Un stade intermédiaire de la division nucléaire où les chromosomes s'alignent sur le plan équatorial de la cellule.

Méthylation Modification d'une molécule par addition d'un groupement méthyle.

Microfilaments Le système de fibres du cytosquelette possédant le plus petit diamètre. Les fibres des microfilaments sont constituées de polymères d'actine.

Microtubules Le système de fibres du cytosquelette possédant le plus grand diamètre. Les microtubules sont constitués de sous-unités de tubuline polymérisées pour former un tube.

Migration d'un branchement d'ADN Lors d'une recombinaison ou d'une transformation, extension de la zone d'appariement partiel entre le brin d'ADN «envahisseur» et le brin complémentaire, accompagnée du déplacement du brin correspondant de l'ADN résident.

Milieu Tout matériau sur ou dans lequel des cultures expérimentales peuvent être réalisées.

Milieu minimum Un milieu ne contenant que des sels inorganiques, une source de carbone et de l'eau.

Mitochondrie Un organite eucaryotique qui est le site de la synthèse de l'ATP et du cycle de l'acide citrique.

Mitose Un type de division nucléaire (se produisant lors de la division cellulaire) qui produit deux noyaux fils identiques au noyau parental.

Mode Dans une distribution statistique, la classe la plus fréquente.

Modèle des cassettes Modèle proposé pour expliquer le changement du signe conjuguant chez la levure. L'information génétique correspondant aux deux signes conjuguants *a* et α est présente sous la forme de «cassettes» silencieuses ; une copie de l'un ou de l'autre type de cassette est transposée dans le locus du signe conjuguant où elle est exprimée (transcrite).

Modèle hétéroduplex (ou hybride) de l'ADN Un modèle expliquant à la fois le crossing-over et la conversion génique par la formation d'un court segment d'ADN hétéroduplex ou hybride (c'est-à-dire formé par les deux ADN parentaux) à proximité d'un chiasma.

Monoploïde Une cellule ne possédant qu'un seul jeu de chromosomes (d'ordinaire à la suite d'une aberration), ou un organisme composé de telles cellules.

Monosomique Une cellule ou un individu qui est fondamentalement diploïde mais qui ne possède qu'une copie d'un chromosome particulier. Son nombre de chromosomes est donc égal à $2n$-1.

Morphogène Une molécule qui induit l'acquisition de destins cellulaires différents selon la concentration de morphogène à laquelle elle est exposée.

Mosaïque Une chimère ; un tissu contenant deux ou plusieurs types de cellules génétiquement distincts, ou un individu composé de tels tissus.

Moyenne La moyenne arithmétique.

Mucoviscidose Affection humaine potentiellement létale touchant les glandes sécrétrices et dont le symptôme le plus frappant est un excès de sécrétion du mucus pulmonaire ; transmise comme un caractère autosomique récessif.

Multiplicité d'infection Le nombre moyen de particules de phage qui infectent une cellule bactérienne dans une expérience déterminée.

Mutagénèse à saturation Induction et récupération de grands nombres de mutations affectant une région du génome ou une fonction donnée en vue d'identifier tous les gènes présents dans cette région ou affectant cette fonction.

Mutagénèse dirigée L'altération d'une partie spécifique d'un gène cloné suivie de la réintroduction du gène modifié dans l'organisme de départ.

Mutagénèse in vitro La production de mutations aléatoires ou spécifiques dans un fragment d'ADN cloné. En général, l'ADN est ensuite réintroduit dans la cellule ou dans un organisme afin d'évaluer les résultats de la mutagénèse.

Mutant Un organisme ou une cellule porteur d'une mutation.

Mutant leaky Un mutant (typiquement un auxotrophe) qui résulte de l'inactivation partielle plutôt que complète de la fonction de type sauvage.

Mutation (1) Le processus qui produit un gène ou un jeu de chromosomes différant de leur équivalent sauvage. (2) Le gène ou le jeu de chromosomes qui résulte de ce processus.

Mutation breeding Voir **accroissement contrôlé de la variation naturelle.**

Mutation chromosomique Voir **aberration chromosomique.**

Mutation conditionnelle Mutation qui ne s'exprime pas dans certaines conditions d'environnement (permissives) mais qui produit un phénotype mutant dans d'autres conditions (restrictives).

Mutation de gain de fonction Une mutation, détectable au niveau phénotypique, qui se traduit par une nouvelle capacité fonctionnelle d'une protéine.

Mutation de phase ou de glissement du cadre de lecture (frameshift mutation) L'insertion ou la délétion de paires de nucléotides avec comme résultat une rupture dans la phase de lecture par les ribosomes.

Mutation faux-sens Une mutation qui altère un codon de telle manière qu'il spécifie un acide aminé différent.

Mutation génique Une mutation due à un changement dans la structure d'un gène.

Mutation germinale Mutation touchant les cellules à l'origine des gamètes.

Mutation homéotique Mutation modifiant le destin d'un disque imaginal.

Mutation instable Mutation qui présente un taux élevé de réversion. Mutation due à l'insertion d'un élément de contrôle, dont l'excision provoque la réversion.

Mutation leaky ou bradytrophe Une mutation qui confère un phénotype mutant mais conserve un niveau faible mais néanmoins détectable de fonction de type sauvage.

Mutation létale à effet maternel Une mutation non létale dans les zygotes mais létale dans la descendance des mères mutantes homozygotes.

Mutation neutre (1) Une mutation qui n'a pas d'effet sur la valeur sélective (ou encore adaptative) de ses porteurs. (2) Une mutation sans effet phénotypique.

Mutation non-sens Une mutation qui altère un gène de manière à y produire un codon non-sens.

Mutation nulle Une mutation qui résulte en la perte complète de la fonction d'un gène.

Mutation pléiotrope Mutation qui affecte plusieurs caractères différents.

Mutation polaire Mutation qui affecte la transcription ou la traduction de gènes distaux par rapport à celui qui contient la mutation - par exemple les mutations non-sens, celles qui modifient le cadre de lecture (frameshift) ou sont induites par les séquences IS.

Mutation ponctuelle Mutation qui affecte un locus spécifique.

Mutation réverse Voir **réversion.**

Mutation secondaire Deuxième élément d'un doublet de mutations au sein d'un gène. La seconde mutation peut supprimer l'effet de la première en restituant un phénotype sauvage au double mutant.

Mutation silencieuse Mutation qui n'altère pas la fonction de la protéine codée par le gène qui la porte.

Mutation somatique Mutation dans une cellule somatique.

Mutation spontanée Mutation qui apparaît en l'absence de traitement mutagène (souvent due au mauvais fonctionnement d'enzymes cellulaires).

BOUNET PENTALIVRES LIBRARY

Mutation suppresseur Mutation qui supprime l'effet d'une autre mutation. Un suppresseur est localisé à un site différent de la mutation qu'il supprime, soit dans le même gène, soit dans un locus éloigné. Des suppresseurs différents agissent de manières différentes.

Mutation thermosensible Mutation conditionnelle qui ne produit un phénotype mutant qu'à haute température.

Muton La plus petite partie d'un gène qui puisse être impliquée dans un événement mutationnel (reconnue à présent comme une paire de nucléotides complémentaires).

Myélome Un cancer de la moëlle osseuse.

Nanomètre (nm) 10^{-9} mètres (1 nm = 10^{-9} m = 10 Å).

Neurospora Une moisissure de couleur rose qui se développe communément sur des restes de nourriture.

Neurofibromatose Une maladie de l'homme caractérisée par des tumeurs des cellules nerveuses et la formation de taches café au lait sur la peau. L'allèle muté résulte en général d'une mutation germinale mais est transmis comme un caractère autosomique dominant.

Neutralité sélective Situation dans laquelle des allèles différents d'un gène donné assurent une valeur adaptative égale.

Nitrocellulose Dérivé de la cellulose utilisé notamment dans la fabrication des filtres retenant l'ADN pour des expériences d'hybridation.

Nodule chromosomique (puff) Zone d'expansion de la chromatine dans un chromosome polytène reflétant la transcription intensive des gènes qui s'y trouvent.

Non-disjonction Le fait que deux homologues (lors de la méiose) ou deux chromatides sœurs (lors de la mitose) ne se séparent pas correctement pour migrer vers des pôles opposés.

Norme de réaction Le profil des phénotypes produits par un génotype donné dans différentes conditions d'environnement.

Nucléase Une enzyme qui peut dégrader l'ADN en rompant ses liaisons phosphodiester.

Nucléoïde Un corpuscule d'ADN dans un chloroplaste ou une mitochondrie, l'équivalent du noyau chez les procaryotes.

Nucléole Un organite présent dans le noyau, contenant de l'ARNr et de multiples copies amplifiées des gènes spécifiant l'ARNr.

Nucléoside Une base azotée liée à une molécule de sucre.

Nucléosome L'unité structurale de base du chromosome eucaryotique ; une boule constituée de huit molécules d'histones autour de laquelle s'enroulent deux tours de la molécule d'ADN.

Nucléotide Une molécule composée d'une base azotée, d'un sucre et d'un groupement phosphate ; l'unité structurale de base des acides nucléiques.

Nul (allèle) Un allèle dont l'effet consiste soit en l'absence du produit normal d'un gène au niveau moléculaire soit en l'absence d'une fonction normale au niveau phénotypique.

Nullisomique Une cellule ou un individu dépourvu d'un type de chromosome particulier et dès lors pourvu d'un nombre chromosomique tel que n-1 ou $2n$-2.

Octade Un asque contenant huit ascospores, produit chez une espèce où la tétrade subit normalement une mitose post-méiotique.

Oligonucléotide Un court segment d'ADN synthétique.

Oncogène Un gène qui provoque le cancer.

Opérateur Une région d'ADN située à l'extrémité proximale d'un opéron, qui agit en tant que site récepteur de la protéine répresseur.

Opéron Un groupe de gènes de structure adjacents dont l'ARNm est synthétisé d'une pièce, plus les signaux régulateurs adjacents qui affectent la transcription de ces gènes.

ORF («Open reading frame») Voir **cadre de lecture ouvert.**

Organisateur nucléolaire Une ou des régions du jeu de chromosomes physiquement associées au nucléole et contenant des gènes d'ARNr.

Organisme transgénique Organisme dont le génome a été modifié par injection d'ADN provenant d'un autre organisme.

Organite Une structure subcellulaire spécialisée dans une fonction particulière — par exemple, la mitochondrie, le chloroplaste, le fuseau mitotique ou le nucléole.

Organogénèse La production des systèmes organiques au cours de l'embryogénèse animale.

Origine de réplication La séquence où la réplication de l'ADN est amorcée.

Paire de gènes Les deux formes d'un gène présentes dans une cellule diploïde (une par jeu de chromosomes).

Paire de gènes hétérozygotes Une paire de gènes ayant des allèles différents dans les deux jeux chromosomiques d'un individu diploïde.

Paire de gènes homozygotes Une paire de gènes formée d'allèles identiques — par exemple AA ou A^1A^1.

Paire de nucléotides Une paire de nucléotides (une dans chaque brin d'ADN) réunis par des liaisons (ou ponts) hydrogène.

Palindrome Séquence d'ADN identique lorsque chaque brin est lu dans la même direction. (par exemple de 5' en 3').

Panachure Apparition dans un tissu de secteurs de phénotypes différents.

Panachure par effet de position Panachure causée par l'inactivation d'un gène dans certaines cellules suite à sa juxtaposition anormale avec une région hétérochromatique.

Paramutation Un phénomène épigénétique chez les plantes dans lequel l'activité génétique d'un allèle normal est réduite héréditairement par le fait que cet allèle s'est trouvé à l'état hétérozygote avec un allèle paragénétique spécial.

Parthénogénèse La production d'une descendance par une femelle sans aucune contribution génétique d'un mâle.

Pathogène Organisme qui provoque une maladie chez un autre organisme.

PCR Voir **réaction de polymérisation en chaîne.**

Pénétrance Proportion d'individus possédant un génotype spécifique qui expriment ce génotype au niveau du phénotype.

Peptide Voir **acide aminé.**

Perte d'un chromosome Non-incorporation d'un chromosome dans un des noyaux issus de la division cellulaire.

Petite Mutation entraînant la formation de petites colonies et une altération des mitochondries chez la levure. Dans le cas de petites cytoplasmiques (petites neutres et suppressives), la mutation est une délétion de l'ADN mitochondrial ; dans les petites ségrégationnelles, la mutation touche l'ADN nucléaire.

Petite neutre Une «petite» (voir ce mot) ne produisant que de la descendance sauvage après croisement avec le type sauvage.

Petite ségrégationnelle Une lignée de petites qui, dans un croisement avec une lignée sauvage, produit 50% de descendants sauvages et 50% de petites ; résulte d'une mutation nucléaire.

Petite suppressive Petite qui, dans un croisement avec le type sauvage, produit une descendance au sein de laquelle la proportion de petites varie de façon non mendélienne.

Phage Voir **bactériophage.**

Phage λ (lambda) Une sorte («espèce») de bactériophage tempéré.

Phage λ*dgal* Un phage λ porteur d'un gène bactérien *gal* et défectif (*d*) pour l'une ou l'autre fonction phagique.

Phage mu Une sorte («espèce») de phage qui possède des propriétés sem-

blables à celles des séquences d'insertion, étant capable de s'insérer, de se transposer, d'inactiver les gènes cibles, et de causer des réarrangements.

Phage tempéré Phage qui peut lysogéniser et devenir un prophage.

Phage virulent Phage qui ne peut s'installer à l'état de prophage. L'infection par un phage virulent provoque toujours la lyse de la bactérie infectée.

Phase de lecture Voir **cadre de lecture.**

Phase G_0 La phase de repos qui intervient pendant la phase G_1 du cycle cellulaire.

Phase G_1 La phase intermédiaire du cycle cellulaire qui précède la phase S.

Phase G_2 La phase intermédiaire du cycle cellulaire qui suit la phase S.

Phase M La phase mitotique du cycle cellulaire.

Phase S La portion de l'interphase du cycle cellulaire où s'effectue la synthèse de l'ADN.

Phe Phénylalanine (un acide aminé).

Phénocopie Phénotype qui ressemble à celui produit par une mutation mais est induit par les conditions de l'environnement.

Phénotype (1) Forme sous laquelle se trouve un caractère (ou groupe de caractères) dans un individu particulier. (2) Manifestations externes d'un génotype spécifique.

Phénotype autonome Chez les organismes multicellulaires, un caractère génétique qui ne se manifeste que dans les cellules qui possèdent le génome mutant. A l'inverse, un caractère *non autonome* est un caractère dont le phénotype s'exprime dans d'autres cellules indépendamment de leur génotype.

Phénotype non autonome Voir phénotype autonome.

Phénotype bigarré Un phénotype des mammifères caractérisé par la présence de taches non pigmentées sur la peau, dues à l'absence de mélanocytes ; transmis comme un caractère autosomique dominant.

Phénotype dominant Le phénotype d'un génotype comportant l'allèle dominant ; le phénotype d'un des parents exprimé chez l'hétérozygote.

Phénotype récessif Phénotype d'un homozygote pour l'allèle récessif ; le phénotype parental qui n'est pas exprimé dans un hétérozygote.

Phénylcétonurie (PCU) Une maladie métabolique humaine causée par une mutation dans un gène de dégradation de la phénylalanine, qui provoque un retard mental si elle n'est pas soignée ; transmise comme un phénotype autosomique récessif.

Pic adaptatif Sommet (pas nécessairement unique) dans un diagramme adaptatif. La sélection tend à amener la composition génotypique d'une population vers une combinaison correspondant à un pic adaptatif.

Pie Le phénotype de mammifères dont la peau comporte des taches non pigmentées en raison de l'absence de mélanocytes ; en général, transmis comme un caractère autosomique dominant.

Pilus (pluriel, **pili**) Appendice creux des bactéries, ressemblant à un cheveu. Certains pili spécialisés, les pili sexuels des cellules donneuses (F^+ et Hfr) d'*E. coli*, sont impliqués dans l'attachement et le maintien du contact avec les cellules réceptrices (F^-) au cours de la conjugaison.

Plage de lyse Zone claire dans un tapis bactérien résultant des infections et lyses successives par un bactériophage et sa descendance.

Plante dioïque Plante chez laquelle les organes mâles et femelles apparaissent sur des individus séparés.

Plante monoïque Se dit d'une espèce de plante chez laquelle les organes mâles et femelles se retrouvent sur la même plante mais dans des fleurs différentes (par exemple, le maïs).

Plasmide Molécule d'ADN extrachromosomique capable de se répliquer de manière autonome.

Plasmide 2μ (2 Mu, deux micromètres) Elément extra-chromosomique circulaire présent chez certaines souches de levure. Utilisé pour construire des vecteurs d'expression et de clonage dans la levure.

Plasmide R Plasmide contenant un ou plusieurs transposons porteurs de gènes de résistance.

Plasmide Ti Plasmide circulaire d'*Agrobacterium tumefaciens* qui confère à la bactérie le pouvoir d'infecter une cellule végétale et d'y produire une tumeur du type gale du collet.

Point chaud («hotspot») Région d'un gène caractérisée par une mutabilité élevée, soit spontanément soit sous l'effet d'un traitement mutagène.

Point de cassure fixe Selon le modèle hétéroduplex de recombinaison, le point où débute le déroulement de la double hélice d'ADN, comme première étape de la formation d'un ADN hétéroduplex.

Points de repère Stades du cycle cellulaire où l'achèvement de certains événements, tels que la réplication du chromosome, est nécessaire pour permettre au cycle de progresser jusqu'au stade suivant.

Poky Mutant mitochondrial à croissance lente de *Neurospora*.

Polarité de conversion génique Gradient de fréquence de conversion le long d'un gène.

Polarité embryonnaire (ou tissulaire) La production d'axes d'asymétrie dans un embryon en développement ou dans le primordium d'un tissu.

Polyacrylamide Matériau utilisé pour préparer des gels d'électrophorèse destinés à la séparation de mélanges de macromolécules.

Polydactylie Un phénotype humain correspondant à la présence de plus de cinq doigts et/ou orteils ; transmis comme un phénotype autosomique dominant.

Polygènes Voir **hypothèse des facteurs multiples.**

Polymorphisme Apparition dans une population (ou parmi des populations) de plusieurs formes phénotypiques associées aux allèles d'un même gène ou aux formes homologues d'un même chromosome.

Polymorphisme de longueur de séquences simples Voir **SSLP.**

Polymorphisme de longueur de fragments de restriction Voir **RFLP.**

Polymorphisme équilibré Polymorphisme génétique stable maintenu par la sélection naturelle.

Polypeptide Chaîne d'acides aminés liés ; une protéine.

Polyploïde Cellule possédant trois ou davantage de jeux de chromosomes ou un organisme composé de telles cellules.

Polysaccharide Polymère biologique dont les unités sont des molécules de sucre — par exemple l'amidon ou la cellulose.

Porteur Individu possédant un allèle mutant qu'il n'exprime pas au phénotype à cause de la présence d'un allèle dominant ; un individu de génotype *Aa* est porteur de *a* si la dominance de *A* sur *a* est totale.

Pouvoir de résolution Capacité d'une technique expérimentale à distinguer deux conditions génétiques (typiquement envisagée lorsqu'une de ces conditions est rare et d'un intérêt particulier).

Prion Particule protéique infectieuse qui cause des maladies dégénératives du système nerveux central, comme le «scrapie» chez le mouton ou la maladie de Creutzfeldt-Jacob chez l'homme.

Pro Proline (un acide aminé).

Procaryote Organisme comportant des cellules procaryotiques comme les bactéries et les algues bleues.

Produit de la méiose Une des quatre (en général) cellules formées au cours des deux divisions méiotiques.

Profil de ségrégation à la première division Pour une paire de gènes, le profil linéaire de distribution des phénotypes des ascospores obtenu lorsque les allèles migrent dans des noyaux différents à la première division méiotique, montrant qu'aucun crossing-over ne s'est produit entre la paire d'allèles et le centromère.

Profil de ségrégation à la 2ème division Pour une paire de gènes, le profil de distribution des génotypes d'ascospores qui montre que la séparation des allèles dans des noyaux différents s'est faite à la deuxième division

méiotique, suite à une recombinaison entre cette paire de gènes et le centromère ; ne se voit que dans les asques linéaires.

Proflavine Mutagène qui tend à produire des mutations de glissement du cadre de lecture.

Promoteur Région de contrôle présente à courte distance de l'extrémité 5' du gène et qui joue le rôle de site de liaison de l'ARN polymérase pour l'initiation de la transcription.

Prophage Chromosome phagique inséré comme une structure d'ADN linéaire dans le chromosome d'une bactérie.

Prophase Stade précoce de la division nucléaire pendant lequel les chromosomes se condensent et deviennent visibles (au microscope).

Propositus Le premier individu à attirer l'attention du généticien dans une généalogie humaine.

Protéine activatrice du catabolisme Voir **protéine CAP.**

Protéine adaptateur Une protéine qui se lie aux séquences d'acides aminés phosphorylés spécifiques d'une seconde protéine, souvent un récepteur transmembranaire, et s'associe aussi à d'autres protéines en permettant à un complexe protéique de s'ancrer au récepteur. L'ancrage place les protéines de ce complexe à proximité les unes des autres et permet ainsi à un signal intracellulaire d'emprunter un trajet de transduction de signal.

Protéine CAP (protéine activatrice du catabolisme) Protéine dont la présence est requise pour l'activation de l'expression de plusieurs opérons de dégradation de sucres, dont l'opéron lactose.

Protéine G Un membre de la famille des protéines qui participent à la transduction des signaux par des interactions protéine-protéine qui ont lieu lorsque la protéine G lie le GTP et non lorsqu'elle lie le GDP.

Protéine kinase Une enzyme qui phophoryle des résidus spécifiques de ses protéines cibles. Une classe importante de protéines kinases phosphoryle des tyrosines, tandis qu'une autre phosphoryle des thréonines ou des sérines de ses protéines cibles.

Protéine kinases cyclines-dépendantes Une famille de protéine kinases qui, après activation par les cyclines et par un ensemble complexe de protéines régulatrices positives et négatives, phosphorylent certains facteurs de transcription dont l'activité est nécessaire à un stade particulier du cycle cellulaire.

Protéines à hélice-boucle-hélice (HLH) Une famille de protéines, où une portion du polypeptide forme des hélices α séparées par une boucle (le domaine HLH) ; cette structure agit comme un domaine de liaison à des séquences spécifiques de l'ADN. Les protéines HLH sont présumées jouer le rôle de facteur de transcription.

Protéines moteurs Protéines qui sont capables de se déplacer de manière unidirectionnelle le long d'un type spécifique de fibres du cytosquelette. Les kinésines et les dynéines sont des protéines moteurs qui interagissent avec les microtubules et les myosines des protéines moteurs qui interagissent avec les microfilaments.En se fixant à d'autres constituants subcellulaires, les protéines moteurs peuvent provoquer des mouvements orientés de ces constituants dans la cellule.

Proto-oncogène Gène qui, lorsqu'il est muté ou altéré d'une autre manière, devient un oncogène.

Protoplaste Cellule végétale ou bactérienne débarrassée de sa paroi.

Prototrophe Souche microbienne qui prolifère en milieu minimum (comparer avec **auxotrophe**).

Provirus Chromosome viral intégré dans l'ADN d'une cellule hôte.

Pseudodominance Apparition soudaine d'un phénotype récessif dans une généalogie, suite à la délétion d'un gène dominant qui le masquait.

Pseudogène Gène inactif dérivé d'un gène ancestral actif.

Puff ou puff chromosomique Voir **nodule chromosomique.**

Purine Type de base azotée ; les bases puriques présentes dans l'ADN sont l'adénine et la guanine.

Pyrimidine Type de base azotée ; les bases pyrimidiques présentes dans l'ADN sont la cytosine et la thymine.

Queue de poly(A) Série de nucléotides adényliques ajoutés à l'ARN messager après la transcription.

RAPD (pour randomly amplified polymorphic DNA) ADN polymorphes amplifiés au hasard Un ensemble de fragments génomiques amplifiés par une même amorce de PCR ; en général, variables d'individu à individu ; des hétérozygotes +/– pour des fragments individuels peuvent servir de marqueurs pour la cartographie génomique.

Rapport mendélien Un rapport de phénotypes de la descendance reflétant l'observance des lois de Mendel.

Rapport non mendélien Un rapport exceptionnel de phénotypes parmi les descendants qui ne reflète pas la simple opération des lois de Mendel ; par exemple, des rapports mutant :sauvage de 3 :5, 5 :3, 6 :2, ou 2 :6 dans des tétrades indiquent que des conversions géniques se sont produites.

Rapport X : A Le rapport du chromosome X au nombre de paires d'autosomes.

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) Une méthode d'amplification de segments d'ADN spécifiques qui exploite certaines caractéristiques de la réplication de l'ADN.

Réarrangement chromosomique Aberration chromosomique caractérisée par de nouvelles juxtapositions de parties de chromosomes.

Réarrangement génique Le processus de changement programmé de la structure de l'ADN des cellules somatiques conduisant à des changements du nombre de gènes ou des propriétés structurales et fonctionnelles du gène réarrangé.

Récepteur Voir **interaction ligand-récepteur**

Récepteur de la tyrosine kinase Un récepteur transmembranaire dont le domaine cytoplasmique possède un activité enzymatique tyrosine kinase. Dans les situations nomales, la kinase n'est activée que lorsqu'un ligand approprié se lie au récepteur.

Récepteur d'hormone stéroïde Une famille de protéines apparentées qui jouent le rôle de facteurs de transcription lorsqu'elles lient les hormones qui leur correspondent. En réalité, tous les membres de cette famille ne lient pas les stéroïdes ; leur nom dérive du premier membre de cette famille à avoir été identifié, qui était effectivement un récepteur d'hormone stéroïde.

Récepteur transmembranaire Une protéine qui traverse de part en part la membrane cytoplasmique d'une cellule, sa portion extracellulaire possédant la capacité de lier un ligand tandis que sa portion intracellulaire est dotée d'une activité (de protéine kinase, par exemple) qui peut donc se trouver induite par la liaison de ce ligand

Recherche systématique de mutants («mutant hunt») Le processus par lequel on accumule différents mutants porteurs d'anomalies dans une structure ou une fonction déterminée, comme recherche préparatoire à l'analyse (ou dissection) mutationnelle de cette fonction.

Recombinaison (1) En général, tout processus dans une cellule diploïde ou diploïde partielle qui produit de nouvelles combinaisons de gènes ou de chromosomes. (2) A la méiose, le processus qui conduit à la formation d'un produit haploïde dont le génotype est différent de chacun des deux génotypes haploïdes qui constituent le diploïde méiocyte.

Recombinaison à spécificité de site Recombinaison qui se produit entre deux séquences spécifiques, qui ne doivent pas présenter d'homologie importante ; elle est catalysée par un système enzymatique spécifique.

Recombinaison interchromosomique Recombinaison due à la ségrégation indépendante des chromosomes paternels et maternels.

Recombinaison intrachromosomique Recombinaison proprement dite résultant d'un crossing-over entre deux paires de gènes situés sur le même chromosome.

Recombinant Individu ou cellule possédant un génotype produit par recombinaison.

Recon Région d'un gène où il ne peut pas y avoir de crossing-over ; maintenant identifiée comme une paire de nucléotides complémentaires.

Redondance terminale Chez un phage, partie du génome répétée aux deux extrémités suite à la maturation de l'ADN à partir d'un concaténat.

Région constante (parfois appelée domaine invariant) Région d'une molécule d'anticorps qui est presque identique aux régions correspondantes dans des anticorps de spécificités différentes.

Région d'attachement à l'armature Voir **SAR**.

Région hypervariable La partie d'une région variable déterminant la spécificité d'un anticorps.

Région interstitielle La région chromosomique située entre le centromère et le site de réarrangement.

Région variable Une région dans une molécule d'immunoglobuline qui montre de nombreuses différences de séquence entre des anticorps de spécificités différentes. Les régions variables des chaînes légères et lourdes d'une immunoglobuline lient l'antigène.

Règle de sommation La probabilité que l'un ou l'autre de deux événements mutuellement exclusifs se produise est égale à la somme de leurs probabilités respectives.

Règle du produit La probabilité pour deux événements indépendants de se produire simultanément est le produit des probabilités individuelles de ces événements.

Régression Terme proposé par Galton pour décrire la tendance des caractères quantitatifs de la descendance à être plus proches de ceux de la moyenne de la population que les caractères de leurs parents. Ceci résulte d'effets de dominance, d'interactions entre gènes et d'influences non génétiques sur ces caractères.

Régulation positive Régulation exercée par une protéine nécessaire à l'activation d'une unité de transcription.

Remplacement de gène L'insertion d'un transgène modifié par manipulation génétique à la place d'un gène résident ; l'insertion s'effectue souvent par un double crossingover.

Renaturation (de l'ADN) Réalignement spontané de deux brins d'ADN pour reformer une double hélice d'ADN.

Rétinoblastome Un cancer de la rétine chez l'homme ; la prédisposition au rétinoblastome est transmise comme un caractère autosomique dominant.

Réparation par excision La réparation d'une lésion de l'ADN par enlèvement du segment incorrect et son remplacement par le segment de type sauvage correspondant.

Réparation par recombinaison Réparation d'une lésion de l'ADN par un processus similaire à la recombinaison, qui utilise les enzymes de la recombinaison.

Réparation SOS Le processus «générateur d'erreurs» («error-prone») par lequel les effets de lésions grossières de l'ADN causées par un traitement mutagène sont circonvenus par le passage de la fourche de réplication au travers de la lésion grâce à une polymérisation non discriminante.

Répétitions en tandem en nombres variables. Voir **VNTR**

Répétition inversée (RI) Une séquence trouvée sous forme identique, mais inversée, par exemple, aux extrémités opposées d'un transposon.

Réplication Le mécanisme de la synthèse de l'ADN.

Réplication conservative Modèle erroné de la synthèse d'ADN proposant qu'une moitié des molécules d'ADN issues de la réplication soit composée de deux brins nouvellement synthétisés.

Réplication dispersive Modèle réfuté de la synthèse d'ADN qui suggérait l'insertion plus ou moins au hasard de segments nouveaux et parentaux dans les molécules filles d'ADN.

Réplication semi-conservative Mode de réplication de la double hélice d'ADN. Chaque double hélice est formée d'un brin parental et d'un brin néosynthétisé.

Replicon Région du chromosome soumise à l'influence d'un locus d'initiation de réplication adjacent.

Réponse à la sélection Différence entre la valeur moyenne d'une population et celle de la descendance née de parents sélectionnés dans cette population.

Répresseur Protéine qui se lie à un opérateur et empêche la transcription d'un opéron (ou d'un gène).

Répression catabolique Réduction de l'expression d'un opéron en réponse à la présence d'une substance qui constitue une meilleure ressource nutritive ou énergétique que le substrat de la chaîne catabolique codée par l'opéron en question. Il s'agit souvent d'un contrôle général surimposé au contrôle spécifique de l'opéron ; il existe, par exemple, une répression catabolique carbonée, azotée, etc.

Rétinoblastome Un cancer de la rétine fréquent chez les enfants.

Rétention de marqueurs Une technique utilisée chez la levure pour apprécier le degré de liaison entre deux mutations mitochondriales.

Rétrotransposon Un élément transposable qui utilise la transcriptase inverse pour effectuer une transposition via un ARN intermédiaire.

Rétrovirus Virus à ARN qui se réplique en donnant d'abord un ADN à double brin.

Réversion Production d'un gène sauvage à partir d'un gène muté.

RFLP (pour restriction fragment length polymorphism) Polymorphisme de longueur de fragments de restriction. A certaines localisations chromosomiques, une sonde permet parfois de détecter des tailles ou des nombres de fragments de restriction différents (souvent en raison de la présence ou de l'absence de sites de restriction). Cette situation est un RFLP. Si un individu est hétérozygote pour une telle différence chromosomique, cette région peut servir de marqueur pour la cartographie chromosomique.

Rho Un facteur protéique requis pour la reconnaissance de certains signaux de terminaison de la transcription chez *E. coli*.

RI Voir **Séquence répétée inversée.**

Ribosome Organite complexe qui catalyse la traduction de l'ARN messager en une séquence d'acides aminés. Composé de protéines et d'ARNr.

Ribozymes ARN doués d'activité enzymatique comme, par exemple, les molécules d'ARN de *Tetrahymena* qui effectuent leur propre excision-épissage.

S (unité de Svedberg) Unité de vitesse de sédimentation, le plus souvent utilisée pour décrire des entités moléculaires de tailles différentes (parce que la vitesse de sédimentation est liée à la taille).

SAR (pour scaffold attachement regions) Régions d'attachement à l'armature ; les sites de l'ADN où celui-ci est ancré à l'armature centrale du chromosome.

Satellite Région terminale du chromosome, séparée du reste (du chromosome) par un étranglement.

Secteur Zone d'un tissu (ou d'une colonie) dont le phénotype diffère de manière visible du phénotype du tissu (ou de la colonie) environnant(e).

Sédimentation Migration d'une molécule ou d'une particule soumise aux effets opposés de la gravité et de la flottaison.

Segmentation Le processus qui assure l'établissement d'un nombre correct de segments au cours du développement des organismes segmentés.

Ségrégation (1) Sens cytologique : séparation de structures homologues. (2) Sens génétique : production de deux phénotypes distincts correspondant à deux allèles d'un gène, chez deux individus (ségrégation méiotique) ou deux tissus (ségrégation mitotique) différents.

Ségrégation alternée Après une translocation réciproque, la ségrégation des deux chromosomes normaux vers un pôle et des deux chromosomes ayant subi la translocation vers l'autre pôle.

PUBLIC CONTROLLED LIBRARY

Ségrégation adjacente Après une translocation réciproque, la ségrégation vers chacun des pôles d'un chromosome ayant subi la translocation et d'un chromosome normal.

Ségrégation indépendante Voir **deuxième loi de Mendel.**

Sélection dépendante de la fréquence Sélection impliquant une valeur adaptative dépendante de la fréquence.

Sélection différentielle Différence entre la valeur moyenne d'une population et celle des individus sélectionnés comme parents de la génération suivante.

Sélection directionnelle Sélection changeant la fréquence d'un allèle dans une direction constante, soit conduisant vers la fixation de cet allèle, soit s'en éloignant.

Sélection familiale Une technique d'amélioration conduisant au choix des partenaires sur la base des performances moyennes de leur descendance.

Sélection indépendante de la fréquence Sélection où les valeurs adaptatives des génotypes sont indépendantes de leur fréquence relative dans la population.

Sélection tronquée Technique de croisement dans laquelle sont sélectionnés comme parents de la génération suivante les individus qui expriment un phénotype au delà ou en deçà d'une certaine valeur, le point de troncature.

Semi-stérilité Phénotype d'individus hétérozygotes pour certaines aberrations chromosomiques qui s'exprime par la formation d'un nombre réduit de gamètes, et donc par une fertilité réduite.

Séquence de réplication autonome (ARS) Région d'une molécule d'ADN nécessaire à l'initiation de sa réplication ; en général un site reconnu par les protéines du système de réplication et où celles - ci se lient.

Séquence d'insertion Voir **éléments IS.**

Séquence initiale Voir **séquence ou région leader.**

Séquence intervenante Voir **Intron.**

Séquence leader (ou guide) Partie proximale (5') non traduite en protéine de la séquence d'un ARNm.

Séquence marqueur (STS ou sequence-tagged site) Une région séquencée relativement réduite d'un fragment génomique cloné qui est utilisée par un ordinateur pour placer le fragment cloné dans un contig.

Séquence répétée inversée (RI) Une séquence identique mais inversée, par exemple aux extrémités d'un transposon.

Séquence signal La séquence amino-terminale d'une protéine sécrétée ; requise pour le transport au travers de la membrane cellulaire.

Ser Sérine (un acide aminé).

Sexduction Transmission de marqueurs chromosomiques bactériens par un plasmide transférable par conjugaison.

Sexe hétérogamétique Le sexe caractérisé par des chromosomes sexuels hétéromorphes (par exemple XY) et donc produisant deux types différents de gamètes en ce qui concerne les chromosomes sexuels.

Sexe homogamétique Le sexe caractérisé par des chromosomes sexuels homologues (par exemple XX).

Signal d'inhibition latérale Signal produit par une cellule, qui empêche les cellules adjacentes d'adopter leur destin normal.

Signalisation paracrine Le processus par lequel une molécule sécrétée se lie à un récepteur situé sur ou dans des cellules voisines, en induisant un trajet de transduction du signal dans la cellule réceptrice.

SINE (ou short interspersed element) Type de courte séquence d'ADN répétée trouvée dans tout le génome eucaryotique.

Site actif Région d'une protéine qui doit être maintenue dans une configuration spécifique pour que la protéine soit fonctionnelle. Par exemple, chez une enzyme, la région à laquelle se lie le substrat.

Sites AP Sites apuriniques ou apyrimidiques résultant de la perte par l'ADN d'une base purique ou pyrimidique.

Site mutationnel La région d'un gène muté qui se trouve endommagée ou modifiée.

Somatostatine Une hormone contrôlant la croissance humaine.

Sonde Segment polynucléotidique défini qui peut être utilisé pour identifier, en général par hybridation suivie d'autoradiographie, une molécule d'ADN comportant la séquence complémentaire.

Souche Lignée pure, généralement d'un organisme haploïde, bactérie ou virus.

Souche-test Lignée homozygote pour un ou plusieurs allèle(s) récessif(s) utilisée dans un croisement test.

Source de carbone Substance nutritive (telle un sucre) qui fournit les squelettes carbonés nécessaires à la synthèse de molécules organiques par l'organisme.

Souris tétraparentale Souris produite à partir d'un embryon résultant de la fusion de deux blastulas.

Sous - dominance Relation phénotypique dans laquelle l'expression d'un gène dans un hétérozygote est moindre que dans l'un ou l'autre des homozygotes.

Spectre d'hôtes Le spectre des souches qui chez une bactérie donnée peuvent être infectées par un phage donné.

Spore Chez les plantes et les champignons, les spores sexuées sont les cellules haploïdes produites à la méiose. Chez les champignons, les spores asexuées sont des cellules somatiques destinées à devenir soit des gamètes, soit les cellules-mères de nouveaux individus haploïdes.

Spore asexuée Voir **spore.**

Spore sexuée Voir **spore.**

Sporophyte Le stade diploïde de développement d'une plante qui produit des spores sexuées, c'est-à-dire le stade auquel se produit la méiose.

SSLP (pour **simple sequence length polymorphism**) Polymorphisme de longueur de séquences simples ; des nombres différents de courts éléments répétitifs (ADN mini- et microsatellites) à un locus particulier des chromosomes homologues d'hétérozygotes ; constituent des marqueurs utiles pour la cartographie génomique.

Structure cruciforme Structure formée localement par l'ADN dans une région contenant des séquences palindromiques ; chaque brin s'apparie avec lui-même et forme une hélice perpendiculaire à la double hélice principale.

Structure en solénoïde Organisation de l'ADN surenroulé dans les chromosomes nucléaires d'eucaryotes.

Structure multimérique Une structure composée de plusieurs sous-unités identiques ou différentes maintenues ensembles par des liaisons non covalentes faibles.

Structure primaire d'une protéine Séquence des acides aminés dans une chaîne polypeptidique.

Structure quaternaire d'une protéine Constitution en sous - unités d'une protéine multimérique.

Structure secondaire d'une protéine Arrangement en feuillet ou en hélice d'un domaine d'une chaîne polypeptidique.

Structure tertiaire d'une protéine Repliement et enroulement de la structure secondaire pour former une molécule globulaire.

STS Voir **séquence marqueur.**

Substitution d'une paire de nucléotides Le remplacement d'une paire de nucléotides par une paire différente.

Supersuppresseur Mutation qui peut supprimer une variété d'autres mutations. Typiquement, un suppresseur de non-sens.

Supresseur Voir **mutation suppresseur.**

Suppresseur d'ambre Allèle mutant codant pour un ARNt dont l'anticodon est modifié de façon telle que l'ARNt insère un acide aminé au niveau

PONTIFICAL UNIVERSITY LIBRARY

d'un codon ambre.

Suppresseur de crossing-over Inversion (généralement complexe) qui rend impossibles l'appariement et le crossing-over entre homologues.

Suppresseur de non-sens Une mutation qui produit un ARNt modifié de telle manière qu'il insère un acide aminé au niveau d'un codon non-sens au cours de la traduction.

Surdominance Une relation phénotypique dans laquelle l'expression phénotypique de l'hétérozygote est plus forte que celle de chacun des homozygotes correspondants.

Surenroulé (ADN) Une molécule d'ADN bicaténaire circulaire et fermée, enroulée sur elle-même.

Surface adaptative Voir **diagramme adaptatif.**

Surinfection Infection d'une cellule, bactérie, ou individu, déjà infecté.

Synapsis Stade d'appariement des chromosomes lors de la méiose. Synonyme de zygotène.

Syncytium Cellule à nombreux noyaux.

Syndrome de Down Un phénotype humain anormal, comportant notamment un retard mental, dû à la trisomie du chromosome 21 ; plus fréquent chez les enfants de mères agées.

Syndrome du «cri du chat» Condition humaine anormale provoquée par la délétion d'une partie d'un des homologues du chromosome 5.

Syndrome de féminisation testiculaire Une maladie humaine, causée par une mutation dans un gène codant pour les récepteurs androgènes, dans laquelle les mâles XY deviennent des femelles phénotypiques au cours du développement.

Syndrome de Klinefelter Un phénotype humain anormal déterminé par un chromosome X surnuméraire (XXY).

Syndrome de Marfan Une maladie humaine touchant les tissus connectifs, qui se manifeste par une série de symptômes, dont de longs membres et de longs doigts, ainsi que des déficiences cardiaques ; se transmet comme un phénotype autosomique dominant.

Syndrome de Turner Phénotype anormal de la femme, produit par la présence d'un seul chromosome X.

Système endocrine Les organes de l'organisme qui sécrètent des hormones dans le système circulatoire.

Système de sélection Technique expérimentale qui facilite la récupération d'individus possédant un génotype spécifique (le plus souvent rare).

Système immunitaire Tissus et cellules de l'organisme qui interviennent dans la reconnaissance et l'attaque des substances étrangères.

T (1) Voir **thymine** ou **thymidine.** (2) Voir **tétratype.**

Taches jumelées Voir **zones jumelées.**

Tapis Une couche continue de bactéries à la surface d'un milieu gélosé.

Tautomérisation Isomérisation spontanée d'une molécule par déplacement d'un atome d'hydrogène. Les tautomérisations cétone-énol ou amine-imine des bases puriques et pyrimidiques entraînent des appariements anormaux de ces bases et provoquent souvent des mutations.

Taux de mutation Le nombre d'événements mutationnels par gène et par unité de temps (par exemple, par génération cellulaire).

Technique du «shotgunning» Voir **clonage à l'aveugle.**

Télomère Extrémité du chromosome.

Télophase Stade le plus tardif de la division cellulaire, au cours duquel les noyaux se reforment.

Tératogène Agent qui interfère avec le développement embryonnaire normal et provoque la formation d'anomalies structurales.

Test cis-trans Permet de déterminer si les sites de deux mutations sont dans la même unité fonctionnelle ou gène ; voir cistron.

Test de Ames Test largement utilisé dans la détection de carcinogènes chimiques potentiels ; il est basé sur le pouvoir mutagène de ces substances chez la bactérie *Salmonella*.

Test de complémentation Voir **test cis-trans.**

Test de fluctuation Un test microbiologique pour établir la nature fortuite des mutations, ou pour mesurer des taux de mutation.

Test de locus Système qui permet de détecter des mutations récessives chez les organismes diploïdes. Des individus normaux mutagénisés sont croisés avec des souches tests homozygotes pour différents allèles récessifs et la descendance est criblée pour les phénotypes récessifs recherchés.

Test d'hétérocaryon Un test de détection de mutations cytoplasmiques basé sur des associations nouvelles de phénotypes chez des cellules obtenues à partir d'hétérocaryons marqués spécifiquement.

Test du chi-carré (χ^2) Méthode statistique permettant d'établir si les différences entre des séries de valeurs expérimentales déterminées indépendamment dépassent ou non les fluctuations attendues entre les valeurs obtenues au sein d'un même groupe d'observations.

Tétrade (1) Quatre chromatides homologues en faisceau, dans la prophase et la métaphase méiotiques. (2) Les quatre cellules filles haploïdes produites par une méiose.

Tétrade linéaire Le produit d'une méiose où les divisions nucléaires se produisent de manière telle que les cellules sœurs se retrouvent adjacentes et disposées en ligne (sans déplacement des noyaux).

Tétrade non linéaire ou non ordonnée Une tétrade dans laquelle les produits de la méiose ne sont pas rangés dans un ordre particulier.

Tétraploïde Une cellule à quatre compléments de chromosomes ou un organisme composé de telles cellules.

Tétratype Tétrade contenant quatre génotypes différents, deux parentaux et deux recombinés.

Théorie chromosomique de l'hérédité La grande théorie unificatrice selon laquelle les schémas de transmission héréditaire sont explicables sur la base de la localisation des gènes en des sites bien définis des chromosomes.

Théorie des perles de collier La théorie réfutée selon laquelle les gènes sont arrangés sur les chromosomes comme les perles sur un collier et ne peuvent pas être divisées en unités plus petites par mutation ou par recombinaison ;

Thérapie génique La correction d'une déficience génétique par l'addition dans une cellule d'un ADN nouveau et son insertion dans le génome.

Thr Thréonine (un acide aminé).

Thymidine Nucléoside contenant la thymine.

Thymine Base pyrimidique qui s'apparie à l'adénine.

Totipotente Cellule dont la descendance peut traverser tous les stades de développement et produire un individu normal.

Traduction Production par les ribosomes d'une chaîne polypeptidique à partir d'un ARN messager.

Trajet de développement (developmental pathway) La succession des événements moléculaires qui affectent un ensemble de cellules équivalentes et leur assignent des destins différents.

Transcriptase inverse Enzyme qui catalyse la synthèse d'un brin d'ADN en prenant un ARN comme matrice.

Transcription Synthèse d'ARN utilisant l'ADN comme matrice.

Transduction Transport de gènes d'une bactérie donneuse vers une bactérie réceptrice par l'intermédiaire d'un bactériophage vecteur.

Transduction abortive Transduction où le fragment d'ADN transducteur n'est pas incorporé dans le chromosome de la souche réceptrice.

Transduction généralisée La capacité de certains phages de réaliser la transduction de n'importe quel gène dans le chromosome bactérien.

POLYTECHNIC CENTRAL LIBRARY

Transduction spécialisée ou restreinte Transduction par un bactériophage qui ne peut transduire qu'une (ou quelques) région(s) du chromosome bactérien.

Transfection Le procédé par lequel de l'ADN exogène en solution est introduit dans des cellules en cultures.

Transfert de Northern (ou **Northern blot**) Transfert de molécules d'ARN séparées électrophorétiquement d'un gel sur une feuille absorbante. Cette feuille est ensuite immergée dans une solution de sonde marquée qui se lie à l'ARN recherché.

Transfert de Southern (ou **Southern blot**) Transfert de fragments d'ADN séparés par électrophorèse, d'un gel sur une feuille de papier ou d'autre matériel absorbant. Cette feuille est ensuite immergée dans une solution contenant une sonde marquée qui se lie au fragment recherché.

Transfert infectieux La transmission rapide dans une population bactérienne d'épisomes libres (accompagnés de tout gène chromosomique qu'ils peuvent porter), de cellules donneuses à des cellules réceptrices.

Transformation (1) Modification d'un génome par l'apport direct d'ADN d'une cellule de génotype différent. (2) Conversion d'une cellule d'eucaryote supérieur en culture en une cellule immortelle au caractère cancéreux.

Transgène Un gène qui a été modifié de manière externe par des techniques de l'ADN recombinant et réintroduit dans le génome par transformation de la lignée cellulaire.

Transition Une substitution de paire de nucléotides qui implique le remplacement d'une purine par une autre purine ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine—par exemple, GC→AT.

Transition allostérique Changement de conformation d'une protéine induit par la fixation d'une molécule à un site distinct du site actif. Egalement, pour une protéine possédant plusieurs sites actifs, changement de conformation d'un ou plusieurs sites actifs induit par la fixation du substrat à l'un d'entre eux.

Translocation Déplacement d'un segment de chromosome vers un nouvel emplacement.

Translocation par insertion L'insertion d'un segment de chromosome dans un autre non homologue.

Translocation réciproque Translocation dans laquelle une partie d'un chromosome est échangée avec une partie d'un autre chromosome non homologue.

Transposition Voir **translocation.**

Transposon Un fragment mobile d'ADN flanqué par des séquences terminales redondantes et, dans les cas les plus typiques, porteur des gènes contrôlant des fonctions de transposition.

Transversion Substitution de paire de bases remplaçant une purine (pyrimidine) par une pyrimidine (purine).

Trappe à amplificateurs Une construction transgénique insérée dans un chromosome, qui est utilisée pour identifier un amplificateur (enhancer) tissu-spécifique dans le génome. Dans une telle construction, un promoteur sensible à la régulation d'un amplificateur est fusionné à un gène rapporteur, de manière à ce que le profil d'expression du gène rapporteur identifie la régulation spatiale conférée par les amplificateurs voisins.

Triage des chromosomes par activation de fluorescence Voir **FACS.**

Trieur à flux Voir **FACS.**

Triplet Les trois bases qui constituent un codon.

Triploïde Une cellule ou un organisme dont les cellules contiennent trois jeux de chromosomes

Trisomique Un diploïde contenant un chromosome surnuméraire, produisant une garniture chromosomique de type $2n + 1$.

Tritium Un isotope radioactif de l'hydrogène.

Trp Tryptophane (un acide aminé).

Types conjuguants L'équivalent chez les organismes inférieurs des sexes chez les organismes supérieurs. D'ordinaire les types conjuguants ne diffèrent que par la physiologie, non par la forme.

Type sauvage Génotype ou phénotype que l'on trouve dans la nature ou dans les souches standard de laboratoire.

Tyr Tyrosine (un acide aminé).

U Uracile ou uridine ;

U.C. Voir **unité cartographique.**

Union aléatoire Union entre individus où le choix des partenaires n'est pas influencé par les génotypes (par rapport aux gènes spécifiquement étudiés)

Unité cartographique (u.c.) La «distance» entre deux loci qui correspond à une fréquence de un pour cent de recombinants parmi les produits de la méiose ; une unité de distance dans une carte génétique.

Uracile Base pyrimidique qui, dans l'ARN, correspond à la thymine présente dans l'ADN.

URF (unassigned reading frame) Voir **cadre ouvert de lecture non attribué.**

Uridine Nucléoside de l'uracile.

Val Valine (un acide aminé).

Valeur adaptative Voir **valeur adaptative darwinienne.**

Valeur adaptative darwinienne («**Darwinian fitness**») La probabilité relative de survie et de reproduction d'un génotype.

Valeur adaptative dépendante de la fréquence Différences de valeur adaptative dont l'intensité varie selon les fréquences relatives des génotypes dans la population.

Valeur adaptative indépendante de la fréquence Valeur adaptative ne dépendant pas des interactions avec d'autres individus de la même espèce.

Valeur mi-parentale La moyenne des valeurs d'un phénotype quantitatif pour deux parents déterminés.

Valeur statistique Valeur calculée, caractéristique d'une population, par exemple, la moyenne.

Variable Paramètre qui peut prendre des valeurs différentes dans des cas différents.

Variance Mesure de la variation de part et d'autre de la classe centrale d'une distribution. La moyenne des carrés des écarts à la moyenne. Carré de l'écart type.

Variance due à la dominance Variance génétique à un locus simple due à la dominance d'un allèle sur l'autre.

Variance due à l'environnement (au milieu) La variance due à la variation du milieu.

Variance génétique Variance phénotypique due aux différents génotypes présents dans la population.

Variance génétique additive Composante de la variance génétique associée à la moyenne des effets de la substitution d'un allèle par un autre.

Variant Organisme qui se distingue de la norme.

Variation Différences entre parents et descendants ou entre individus d'une même population.

Variation quantitative Pour un caractère spécifique, l'existence d'une gamme de phénotypes montrant une gradation plutôt que des différences qualitatives discrètes.

Vecteur navette Vecteur de clonage dérivant d'un virus ou d'un plasmide et construit de telle manière qu'il puisse se propager dans au moins deux hôtes d'espèces différentes.

Viabilité La probabilité qu'un œuf fécondé survive et se développe en organisme adulte.

Virus tumorigène Virus capable d'induire un cancer.

BOURKE (CENTRAL UNIVERSITY) LIBRARY

Vitesse de mutation Le nombre d'événements mutationnels par gène et par unité de temps (par exemple par génération cellulaire).

VNTR (pour **variable number tandem repeat**) Un locus chromosomique où une séquence répétée particulière est présente en nombres différents chez des individus différents ou dans deux chromosomes homologues d'un individu diploïde.

X attachés Paire de chromosomes X chez la *Drosophile*, attachés par une extrémité et transmis à la descendance comme une seule entité.

Zones jumelées Paire de secteurs mutants au sein d'un tissu de type sauvage résultant d'un crossing - over mitotique chez un individu hétérozygote.

Zygote La cellule résultant de la fusion d'un œuf et d'un spermatozoïde. La cellule diploïde dont la multiplication mitotique produira un organisme diploïde différencié.

Zygote biparental Zygote de *Chlamydomonas* contenant de l'ADNcp provenant des deux parents ; de telles cellules sont rares.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Solutions de certains des problèmes

Chapitre 1

3. L'ADN détermine tous les attributs spécifiques d'une espèce (allure, taille, forme, comportement, caractéristiques biochimiques, etc.) et définit les limites de la variation qui peut être induite par l'environnement.

4. Deux propriétés essentielles qui permettent à l'ADN de jouer son rôle de matériel l'héréditaire sont son aptitude à se répliquer et sa stabilité qui porte cependant en elle la capacité de changer (muter). D'autres formes de vie pourraient utiliser, comme le font certains virus, l'ARN comme molécule héréditaire. Toutefois, parmi les types de molécules qui peuvent exister sur la terre, seuls les acides nucléiques possèdent les propriétés requises pour jouer ce rôle.

6. La variation phénotypique dans une espèce peut être due au génotype, à des effets de l'environnement ou au hasard (fluctuations aléatoires).

9. Le but de la dissection génétique est de comprendre le fonctionnement de tous les gènes qui affectent un trait spécifique, de connaître la séquence d'ADN de chaque gène et de comprendre la régulation qui agit sur chacun de ces gènes au cours du développement.

Chapitre 2

2. Faites un croisement test.

4. a. 9

b. 1 : 2 : 1 : 2 : 4 : 2 : 1 : 2 : 1

c. Génotypes = 3^n

Phénotypes = 2^n

d. Autofécondation et croisement test

5. a. $(1/6)^3$

b. $(1/6)^3$

c. $(1/6)^3$

d. $(5/6)^3$

e. $3(1/6)^3$

f. $2(1/6)^3$

g. $(1/6)^2$

h. 5/9

7. a. 1/8, 3/8, 3/8

b. 9/16

10. 5/8

16. b. 0,0069

21. b. 0,005

c. 3/4

25. 1 nain : 1 normal : 1 neurofibromatose : 1 nain, neurofibromatose

28. a.
1. 9/128
2. 9/128
3. 9/64
4. 55/64

b.
1. 1/32
2. 1/32
3. 1/16
4. 15/16

32. a. Trois années d'autofécondation produisent 0,725 *AA* : 0,05 *Aa* : 0,225*aa*

b. 0,05 restent hétérozygotes

c. $(1/2)^n X$, où n = le nombre de générations et X = le pourcentage initial d'hétérozygotie.

Chapitre 3

2. Elles seront toutes les deux *Aa Bb Cc*

3. 1 ad^+a, blanche; 1 ad^-a, pourpre; 1 $ad^+\alpha$, blanche; 1 $ad^-\alpha$, pourpre

6. a. 92 chromatides

b. 92 chromatides

BOU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

c. 92 chromatides

d. 92 chromatides

e. 46 chromatides

7. e. L'appariement des chromosomes.

8. 1/8

9. $(1/2)^{n-1}$

11. La femelle est *G*, le mâle est *gg*.

13. e. 0

15. a. 1/8

b. 1/4

c. 0

17. a. X^CX^c, X^cX^c

b. 1/4

c. 1 normal : 1 daltonien

d. 1 normal : 1 daltonien

19. e. 1/4

23. Utilisons comme symbolisme *B* = rouge; *b* = brun; *S* = aile longue; *s* = aile courte

P *bb ss* x *BB SY*
F1 1/2 femelles *Bb Ss*
1/2 mâles *Bb sY*
gamètes de la F1
femelles : 1/4 *BS* : 1/4 *Bs* : 1/4 *bS* : 1/4 *bs*
mâles : 1/4 *Bs* : 1/4 *bs* : 1/4 *BY* : 1/4 *bY*
Femelles F2
1/16 *BBSs* rouge, aile longue
1/16 *BBss* rouge, aile courte
2/16 *BbSs* rouge, aile longue
2/16 *Bbss* rouge, aile courte
1/16 *bbSs* brun, aile longue
1/16 *bbss* brun, aile courte
Mâles F2
1/16 *BBSY* rouge, aile longue
1/16 *BBsY* rouge, aile courte
2/16 *BbSY* rouge, aile longue
2/16 *BbsY* rouge, aile courte
1/16 *bbSY* brun, aile longue
1/16 *bbsY* brun, aile courte

Le rapport phénotypique F2 est 3/8 rouge, aile longue : 3/8 rouge aile courte : 1/8 brun, aile longue : 1/8 brun, aile courte

28. Autosomique dominant avec expression limitée aux mâles.

Chapitre 4.

1. L'accouplement est *AOxAB*. Les enfants sont

Génotype	Phénotype
1 *AA*	*A*
1 *AB*	*AB*
1 *AO*	*A*
1 *BO*	*B*

4. (e) 0 pourcent.

5. a. Les relations de dominance sont les suivantes : b > s > e > a

7. Le mari et le père de l'enfant 1; l'amant de l'enfant 2; l'un comme l'autre peuvent être le père de l'enfant 3.

11. Le croisement de départ était *Aa* x *Yy*. La descendance attendue comporte :

1 *Aa* femelles à soies courtes
1 *aa* femelles à soies longues
1 *aY* mâles à soies longues
1 *AY* mâles non-viables.

13. P *AABB* (fruits discoïdaux) x *aabb* (fruits allongés)
F1 *AaBb* (discoïdaux)
F2 9 *A-B-* (discoïdaux)
3 *aaB-* (sphériques)
3 *A-bb* (sphériques)
1 *aabb* (allongés)

15. a. Les frisées sont *Aa*. Les normales et les laineuses sont homozygotes.
b. Croisez normales x laineuses.

18. a. Chez la lignée 1, l'allèle sauvage produit de la pisatine et le récessif n'en produit pas. Chez la lignée 2, l'allèle sauvage permet l'expression de la pisatine normalement produite par le premier gène tandis que sa forme dominante empêche la synthèse de ce produit du gène sauvage.

b. Croisement 1 : P *aabb x AAbb*
F_1 *Aa bb*
F_2 3*A—bb*
1 *aa bb*
Croisement 2 : P *AA BB x AA bb*
F_1 *AA B b*
F_2 3*AAB—*
1 *AA bb*
Croisement 3 : P *aabb x AABB*
F_1 AaBb
F_2 9 *A-B-* pas de pisatine
3 *A-bb* pisatine présente
3 *aaB-* pas de pisatine
1 *aabb* pas de pisatine.

c. La lignée 1 ne produit pas de pisatine, alors que la lignée 2 bloque l'expression de la pisatine.

19. Il est possible d'obtenir une descendance noire à partir de deux

BCU ST / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

parents albinos de race pure si l'albinisme est dû à l'action d'allèles de deux gènes différents. Si dans le croisement suivant il y a épistasie :

Aabb x *aaBB*

tous les descendants seront

AaBb

et phénotypiquement noirs en raison de l'effet complémentaire des gènes.

23. b. 9/32.

26. a. P *AA* (agouti)x *aa* (non-agouti)

gamètes *A* et *a*

F_1 *Aa* (agouti)

gamètes *A* et *a*

F2 1 *AA* (agouti):2 *Aa* (agouti): 1 *aa* (non-agouti)

b. P *BB* (type sauvage) x *bb* (cannelle)

gamètes *B* et *b*

F_1 Bb (type sauvage)

gamètes *B* et *b*

F_2 1 *BB* (type sauvage) :2Bb (type sauvage): 1 *bb* (cannelle)

c. P *AAbb* (cannelle ou brun agouti) x *aaBB* (noir non-agouti)

gamètes *Ab* et *aB*

F_1 *AaBb* (type sauvage ou noir agouti)

d. 9 *A-B-* noir agouti

3 *aaB-* noir non-agouti

3 *A-bb* cannelle

1 *aabb* chocolat

e. P *AAbb* (cannelle) x *aaBB* (noir non-agouti)

gamètes *Ab* et *aB*

F_1 *AaBb* (type sauvage)

gamètes *AB*, *Ab*, *aB* et ab

F_2 9*A-B-* type sauvage

1 *AABB*

2 *AaBB*

2 *AABb*

4 *AaBb*

3 *aaB-* noir non-agouti

1 *aaBB*

2 *aaBb*

3 *A-bb* cannelle

1 *AAbb*

2 *Aabb*

1 *aabb* chocolat

f. P *AaBb* x *AAbb* *AaBb* x *aaBB*

(type sauvage) (cannelle) (type sauvage) (noir non-agouti)

F_1 1 *AABb* type sauvage 1 *AaBB* type sauvage

1 *AaBb* type sauvage 1 *AaBb* type sauvage

1 *AAbb* cannelle 1 *aaBB* noir non-agouti

1 *Aabb* cannelle 1 *aaBb* noir non-agouti

g. P *AaBb* x *aabb*

(type sauvage) (chocolat)

F1 1 *AaBb* type sauvage

lAabb cannelle

I aaBb noir non-agouti

laabb chocolat

h. croisement 1: Le parent F1 est *AA* et l'albinos de départ doit être *ccAAbb*.

croisement 2 : Le parent albinos doit être *ccAABB*.

croisement 3 : La F1 doit être *CcAaBB* et le parent albinos doit être *ccaaBB*

croisement 4 : Le parent albinos doit être *ccaabb*

29. Le croisement est le suivant :

P *Aapp* x *aaP/Y*

F1 *AaPp* femelles à yeux pourpres

Aap/Y mâles à yeux rouges.

F2	Femelles :	Mâles
	3/8 *A-Pp* pourpre	3/8 *A-P/Y* pourpre
	3/8 *A-pp* rouge	3/8 *A-p/Y* rouge
	1/8 *aaPp* blanc	1/8 *aa P/Y* blanc
	1/8 *aapp* blanc	1/8 *aa p/Y* blanc

31. La graine est *AaCCRr*.

33. a. Le croisement est le suivant :

P. *td su* (type sauvage) x t^+dsu^+ (type sauvage)

F_1. 1 *td su* type sauvage

1 *td* su^+ exige du tryptophane

1 td^+su^+ type sauvage

1 td^+su type sauvage

b. 1 exigeant du tryptophane : 3 n'exigeant pas de tryptophane.

37. Ce genre de pedigré est très commun . Il indique un manque de pénétrance dû à l'épistasie ou aux effets du milieu. Les individus A doivent posséder le gène autosomique dominant.

39. a. Il s'agit d'un croisement dihybride avec un seul phénotype coloré dans la F_2. Le rapport blanches/rouges montre que le double récessif n'est pas le phénotype coloré, mais que la formule générale pour l'expression de la coloration est représentée par *X-yy*.

Supposons que la lignée 1 est *AABB* et la lignée 2 *aabb*. La F_1 est donc *AaBb*. Si *A* bloque la coloration chez la lignée 1 et *bb* chez la lignée 2, la F_1 sera blanche du fait de la présence de *A*. La F_2 se présentera comme suit :

9 *A-B-* blanches du fait de *A*

3 *A-bb* blanches du fait de *A*

3 *aaB-* rouges

BCU LAUSANNE / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1 *aabb* blanche du fait de *bb*

b. croisement 1 : *AABB x AaBb* tous *a -b-* blanches
croisement 2 : *aabb x AaBb* 1/4 *AaBb* blanches
1/4 *Aabb* blanches
1/4 *aabb* blanches
1/4 *aaBb* rouges

41. a.

Croisement	Parents	Descendances
1	A^SA^S x A^DA^D	A^SA^D

Conclusion: A^S est dominant par rapport à A^D

2	A^SA^D x A^SA^D	$3A^S$- 1 A^DA^D

Conclusion : suppporte la conclusion du croisement 1

3	A^DA^D x $A^{Sd}A^D$	1 $A^{Sd}A^D$: 1 A^DA^D

Conclusion : A^{sd} est dominant par rapport à A^D

4	4 A^SA^S x $A^{Sd}A^D$	1 $A^{Sd}A^S$: 1 A^SA^D

Conclusion : A^{sd} est dominant par rapport à A^S

5	A^DA^D x $A^{Sd}A^S$	1 $A^{Sd}A^D$: 1 A^DA^S

Conclusion : appuie la conclusion de l'hétérozygote superdouble

6	A^DA^D x A^SA^D	1A^DA^D : 1A^DA^S

Conclusion : appuie la conclusion de l'hétérozygote superdouble

b. Quoique l'explication soit valable pour tous les croisements, elle ne tient pas compte ni de la stérilité femelle ni de l'origine de la plante superdouble à partir d'une variété à fleurs doubles.

De nombreux mécanismes génétiques pourraient être proposés pour expliquer l'origine du superdouble à partir de la variété à fleurs doubles. La plupart d'entre eux seront envisagés dans des chapitres ultérieurs et donc ne seront pas mentionnés ici. Cependant, on peut certainement affirmer à ce stade-ci que, quelque soit le mécanisme en cause, il était suffisamment aberrant que pour bloquer la formation de la structure complexe des fleurs femelles. Du fait de cette stérilité femelle, aucun homozygote ne peut être observé.

43. a. Un croisement trihybride donnerait lieu à un rapport 63:1. Donc, trois loci R ségrègent dans ce croisement.

b. P. $R_1R_1\ R_2R_2R_3R_3$ x $r_1r_1\ r_2r_2\ r_3r_3$
F_1 $R_1r_1\ R_2r_2R_3r_3$

F_2	27 $R_1-\ R_2-\ R_3-$	rouge
	9 $R_1-\ R_2-r_3r_3$	rouge
	9 $R_1-\ r_2r_2R_3-$	rouge
	9 $r_1r_1\ R_2-\ R_3-$	rouge
	3 $R_1-\ r_2r_2\ r_3r_3$	rouge
	3 $r_1r_1\ R_2-\ r_3r_3$	rouge
	3 $r_1r_1\ r_2r_2\ R_3-$	rouge
	1 $r_1r_1\ r_2r_2\ r_3r_3$	blanc

c. 1. Pour obtenir un rapport 1/1, un seul des gènes peut être hétérozygote. Un croisement type serait $R_1r_1r_2r_2r_3r_3$ x $r_1r_1r_2r_2r_3r_3$.

2. Pour obtenir un rapport de 3 rouges : 1 blanc, deux allèles doivent ségréger et ils ne peuvent concerner le même gène. Un croisement type serait $R_1r_1R_2r_2r_3r_3$ x $r_1r_1r_2r_2r_3r_3$.

3. Pour obtenir un rapport de 7 rouges : 1 blanc, trois allèles doivent ségréger et ils ne peuvent concerner le même gène. Le croisement serait $R_1r_1R_2r_2R_3r_3$ x $r_1r_1r_2r_2r_3r_3$.

d. La formule est 1 - $(1/2)^N$, où N est le nombre de loci qui ségrègent dans les croisements types mentionnés au-dessus. Dans le cas de croisements F1, la formule est 1- $(1/2)^N$ où N est le nombre de loci.

45. a. Le gène cause du scléra bleu et de la fragilité des os est de nature pléiotropique et à expression variable.

b. L'allèle se comporte comme un autosome dominant.

c. A la fois une pénétrance incomplète et une expressivité variable se dégagent de l'arbre généalogique. Les individus II-4, II-14, III-23 et III-14 sont des descendants porteurs de l'anomalie tout en ne l'exprimant pas eux-mêmes. Il en résulte que 4 des 20 personnes possèdent le gène mais il ne s'exprime pas chez eux. Le pourcentage de pénétrance est donc de 80%. Des 16 individus exprimant phénotypiquement l'allèle, 9 ne présentent pas de fragilité osseuse. Généralement l'expressivité se décrit comme nulle, variable ou très variable, plutôt que de s'exprimer en pourcentage.

47. a. Le gène est sur le chromosome X. Il s'agit d'une série d'allèles multiples avec ovale > en faucille > ronde.
Si W^O= ovale, W^S = en faucille et W^r = ronde.
Les trois croisements sont
Croisement 1 : W^sW^s x $W^rY \rightarrow W^sW^r : W^sY$
Croisement 2 : W^rW^r x $W^sY \rightarrow W^sW^r : W^rY$
Croisement 3 : W^sW^s x $W^OY \rightarrow W^OW^s : W^sY$

b. W^OW^s x $W^rY \rightarrow$ 1 W^OW^r : 1 W^sW^r : 1W^OY : 1 W^sY, ou une femelle ovale : 1 femelle en faucille : 1 mâle ovale : 1 mâle en faucille.

49. a. Désignons platine par *a*, aléoutien par *b* et le sauvage par *A-B-*.

Croisement 1	P	*AABB* x *aaBB*
	F_1	*Aa BB*
	F_2	3*A—BB* : 1 *aaBB*
Croisement 2	P	*AABB* x *AAbb*
	F_1	*AA Bb*
	F_2	3*AAB—* : 1 *AAbb*
Croisement 3:	P	*aa BB* x *AA bb*
	F_1	*AaBb*
	F_2	9 *A—B—* sauvage
		3 *A—b b* aléoutien
		3 *a a B—* platine
		1 *aabb* saphir

b.

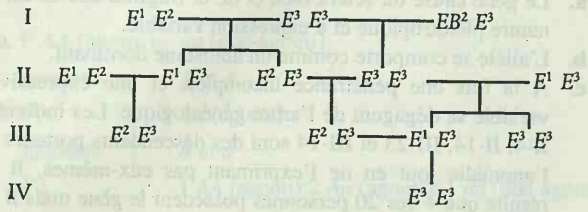
	Saphir x platine		saphir x aléoutien	
P	*aa bb* x *aaBB*		*aa bb* x *AA bb*	
F_1	*aaBb*	platine	*Aabb*	aléoutien
F_2	3 *aaB-*	platine	3 *A-bb*	aléoutien
	1 *aabb*	saphir	1 *aabb*	saphir

BCIT/CITAL UNIVERSITY LIBRARY

51. a. Désignons le gène par *E* avec

E^1 = noir
E^2 = brun
E^3 = sans yeux

Si en plus, sur la base des différents croisements, nous considérons que noir > brun > sans yeux, les génotypes de l'arbre généalogique sont



b. Le génotype de l'individu II-3 est E / E^3.

Chapitre 5

1. 45 pourcent de la descendance sera *AaBb*.

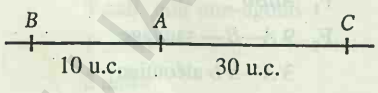
2. P *Ad/Ad* x *aD/aD*
F_1 *Ad/aD*
F_2 1 *Ad/Ad*
2 *Ad/AD*
1 *aD/aD*

4. Les deux gènes sont liés et distant de 33.3 unités cartographiques (u.c.)

5. On ne retrouve que des types parentaux ce qui implique que les deux gènes sont très proches l'un de l'autre et la recombinaison un évènement rare.

8. a. 4 pour cent
b. 4 pour cent
c. 46 pour cent
d. 8 pour cent

11. a. Les quatre gènes sont liés.
b. et c. La carte se représente comme suit



Les chromosomes parentaux sont B (A,d) c / b (a,D) C. L'ordre des gènes entre parenthèses n'est pas connu.

d. interférence = 0.5

12. a. Les plantes mâles doivent être hétérozygotes pour les deux gènes; ceux-ci sont étroitement liés : MF/ mf.
b. mf/mf
c. Le sexe est déterminé par la contribution de la plante mâle. Les deux gamètes parentaux sont MF, responsable du sexe mâle (MF/mf), et mf, responsable du sexe femelle (mf/mf). Une recombinaison éventuelle donnerait lieu à MF ce qui entraîne une plante hermaphrodite (mf/mf), et à mF, entraînant une sterilité totale (mF/mf).
d. Une recombinaison chez la plante mâle donnant lieu à Mf.
e. Les hermaphrodites sont rares du fait de la liaison étroite entre les deux gènes.

15. a. *a-b*: 100% (91 + 9)/1001 = 10 u.c.
b-c: 100% (171 + 9) / 1001 = 18 u.c.

b. coefficient de coïncidence = 0.5

17. v-b : 18 u.c.
b-lg : 28.0 u.c.
coefficient de coïncidence = 0.79

20. 1. *bac*
2. *bac*
3. *bac*
4. *acb*
5. *acb*

22. a. L'hypothèse étant que les gènes ne sont pas liés, un rapport 1:1:1:1 est attendu.
b. $\chi^2 = 0.76$
c. Avec 3 degrées de liberté, la valeur de p se situe entre 0.50 et 0.90.
d. Des valeurs s'écartant de la prévision seraient obtenues uniquement par chance 50 à 90 pourcent du temps.
e. Acceptez l'hypothèse de départ.
f. Puisque la valeur du χ^2 est faible, les deux gènes ségrègent indépendamment. Les génotypes des individus sont

P	*dp⁺ dp⁺ ee* x *dpdp e⁺e⁺*	
F_1	*dp⁺ dp e⁺e*	
Testeur	*dp dp ee*	
Descendance	longues, ébène	*dp⁺ dp ee*
	longues, gris	*dp⁺ dp e⁺e*
	courtes, gris	*dp dp e⁺e*
	courtes, ébène	*dp dp ee*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

29. Si A = résistance à la rouille 24, a= sensibilité à la rouille 24
B = résistance à la rouille 22, b= sensibilité à la rouille 22

a. P *AAbb* (770B) x *aa BB* (Bombay)
F_1 *Aa Bb* x *Aa Bb*
F_2 184 *A—B—*
63 *A-bb*
58 *a a B—*
15 *aa bb*
320

b. Nous prévoyons :
180 *A—B—*
60 *A—B b*
60 *aa B—*
20 *aabb*
χ^2 =1.555, pas significatif; hypothèse acceptée.

31. a. La sclérose bleue apparaît être une déficience autosomique dominante. L'hémophilie est un caractère récessif lié à l'X.

b. Si les individus dans la famille sont désignés de la génération I jusqu'à la IV et les individus à chaque génération sont numérotés dans le sens des aiguilles d'une montre, en débutant en haut et à droite de l'arbre généalogique, leurs génotypes sont

I. *bb Hh, Bb HY*

II. *BbHY, BbHY, bbHY, BbH—, bbHY, BbHh, BbH—, bbH—*

III. *bbH—, BbH—, bbhY, bbHY, BbHY, BbH—, BbHY, BbhY, BbH—, bbHY, BbH—, bbHY, BbH—, BbHY, BbhY, bbHY, bbHY, bbH—, bbHY, bbHY, BbH—, BbHY, BbhY*

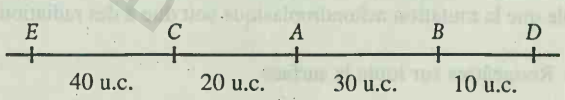
IV. *bbH—, BbH—, BbH—, bbHh, bbHh, bbHY, bbHH, bb HY, bb Hh, bb H—, bb H—, bb HY, bb HY, bb H—, bbHY, bbHY, BbHY, bbHY, bbHH, bbHY, bbHY, bb HH, bb H—, bb H—, bb H—, bb HY, bb HY, bb HY, bbHh, BbH—, BbH—, BbHY, bbHY, BbHY, bbH—*

c. Il n'y a aucune évidence d'une liaison entre les deux maladies.

d. Les deux gènes ségrègent indépendamment

e. Aucun des individus ne peut être considéré comme un recombinant intrachromosomique.
Cependant, un certain nombre est le résultat d'une recombinaison interchromosomique : tous les individus dans la génération III présentant les deux maladies.

34. a. E C A B D



b. Pas d'interférence.

36. a. 0,0336
b. 0,182

Chapitre 6

1. a. +, +, *al-2, al-2*, +, +, *al-2, al-2*
al-2, al-2, +, +, *al-2, al-2*, +, +

b. 4 pour cent

3. a. $f(0) = e^{-2}2^0/0! = e^{-2} = 0{,}135$

b. $f(1) = e^{-2}2^1/1! = e^{-2}(2) = 0{,}27$

c. $f(2) = e^{-2}2^2/2! = e^{-2}(2) = 0{,}27$

6. a. 25,5 u.c.

b. $\chi^2 = 2{,}52$.
En considérant qu'il y a trois degrés de liberté, la probabilité que les trois gènes ne soient pas liés est supérieure à 10 pour cent. L'hypothèse d'une absence de liaison est donc valable.

7. a. Les parents étaient

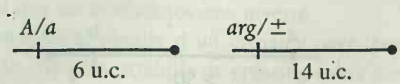
$\underline{ad^- nic^+}$ $\underline{leu^+ arg^-}$ X $\underline{ad^+ nic^-}$ $\underline{leu^- arg^+}$

b. La culture 16 provenait d'un crossing-over entre *ad* et *nic*. La combinaison réciproque n'est pas apparue dans le petit échantillon analysé.

8. a. 0.28
b. 0.35
c. 0.22
d. 0.72

9. a. 0.704
b. 0
c. 0.176
d. 0.012
e. 0.096
f. 0
g. 0.012

11. a.

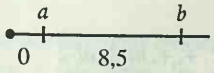


b. La classe 6 s'obtient si un seul crossing-over se produit entre les chromatides 2 et 3, entre chacun des gènes concernés et son centromère.

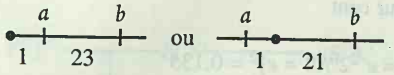
BOUJASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

13. Crois. 1:

Crois. 2:

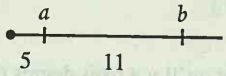


Crois. 3:



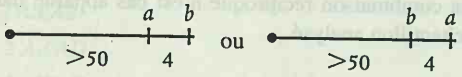
Le premier schéma donne une meilleure interprétation des résultats

Crois. 4 :

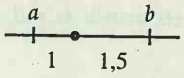


Crois. 5 : *DP* = *DNP*. Les gènes ne sont pas liés à leurs centromères.
a–centromère = 100% 1/2(22 + 8 + 10 +20)/99 = 30,3 u.c. et *b*-centromère = 100% 1/2(24 + 8 + 10 +20)/99 = 31,3 u.c. Lorsque l'analyse de tétrades donne des valeurs aussi élevées, on considère que les gènes ne sont pas liés à leurs centromères.

Crois. 6 :

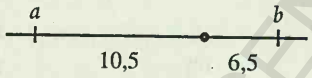


Crois. 7 :

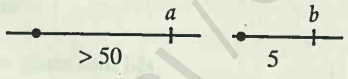


Crois. 8 : Les gènes ne sont pas liés à leurs centromères (cf crois. 5).

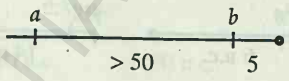
Crois. 9 :



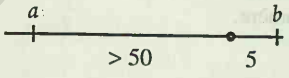
Crois. 10 :



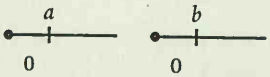
ou



ou



Crois. 11 :

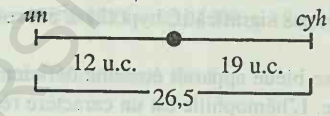


15. Crois.1 : *FR* non corrigée = 26,5 %
distance cartographique non corrigée = 26,5 u.c.
distance cartographique corrigée = 34,5 u.c.
Crois.2 : *FR* non corrigée = 19,5 %
distance cartographique non corrigée = 19,5 u.c.
distance cartographique corrigée = 29 u.c.
Crois.3 : *FR* non corrigée = 30 %
distance cartographique non corrigée = 30 u.c.
distance cartographique corrigée = 40 u.c.

17. a. Un asque 4 : 0 est un asque DP. L'asque 3 : 1 doit correspondre à un tétratype. L'asque 2 : 2 est un ditype non parental.

b. DP = DNP = 40, DNP/T = 40/20 = 2

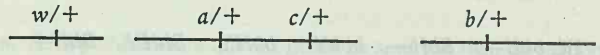
22. La carte finale est



23. a. 0 %
b. 84 %
c. 16 %
d-g. 0 %

26. Les cellules filles seraient *GG* (jaunes) et *gg* (vertes).

27.



Chapitre 7

1. Le pétale sera *Ww*, ou bleu, soit entièrement soit en partie, suivant le moment auquel la réversion est survenue.

3. Etalez les cellules sur un milieu sans proline. Presque toutes les colonies proviendront de révertants. Le reste sera constitué de suppresseurs en d'autres sites.

6. $1/10^{-6}$ divisions cellulaires.

8. Colorez les grains de pollen, qui sont haploïdes, provenant d'une lignée parentale *Wx* homozygote avec de l'iode. Recherchez les grains devenus rouges, indices de mutations *wx*, au microscope.

10. Une affection liée à X ne peut se transmettre de père en fils. Comme le gène de l'hémophilie doit provenir de la mère, la station nucléaire ne peut être tenue comme responsable. Il est possible que la mutation achondroplasique soit due à des radiations.

13. a. Rougeâtres sur toute la surface
b. idem
c. Nombreuses petites taches rouges

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

d. Quelques taches rouges, assez grandes
e. Comme en c, mais moins nombreuses
f. Comme en d, mais moins nombreuses
g. Quelques grandes taches rouges et de nombreuses petites

16. Mutant 1 : un auxotrophe ne poussant que sur milieu complet.
Mutant 2 : une mutation sensible à la température est dominante.
Mutant 3 : une mutation auxotrophe conditionnelle.
Mutant 4 : une mutation sensible à la température et conditionnelle.
Mutant 5 : une mutation auxotrophe, sensible à la température et conditionnelle.

18. a. L'expérience était conçue pour détecter le nombre de gènes impliqués dans la locomotion.

b.

Gène	Mutants
A	1,5
B	2, 6, 8, 10
C	3, 4
D	7, 11, 12

c. Mutant 1 : $AAB^+B^+C^+C^+D^+D^+$
Mutant 2 : $A^+A^+BBC^+C^+D^+D^+$
Mutant 5 : $AAB^+B^+C^+C^+D^+D^+$
Hybride 1/2 : $AAB^+B^+C^+C^+D^+D^+$ X $A^+A^+BBC^+C^+D^+D^+ \rightarrow AA^+B^+BC^+C^+D^+D^+$
Hybride 1/5 : $AAB^+B^+C^+C^+D^+D^+$ X $AAB^+B^+C^+C^+D^+D^+ \rightarrow AAB^+B^+C^+C^+D^+D^+$

Chez l'hybride 1/2 il y a complémentation. Chez l'hybride 1/5 les mutations sont dans le même gène et la complémentation ne peut se produire.

21. Le croisement est arg^r X arg^+, ou arg^r est le révertant. Cependant, il pourrait tout aussi bien être arg^-su X arg^+su^+, où su^+ n'exercerait aucun effet sur le gène *arg*.

a. Si la réversion est un retour exact au type sauvage, 100 pourcent de la descendance doit être indépendante de l'arginine.

b. Si une mutation suppresseur sur un chromosome différent est impliquée, le croisement est du type arg^-su X arg^+su^+. L'assortiment indépendant donnerait alors :

1 arg^-su indépendant de l'arginine
1 arg^+su^+ indépendant de l'arginine
1 arg^-su^+ dépendant de l'arginine
1 arg^+su indépendant de l'arginine

c. Si une mutation suppresseur s'est produite à 10 unités du locus *arg*, le croisement est toujours arg^-su X arg^+su^+, mais il faut maintenant représenter le diploïde intermédiaire comme arg^-su/arg^+su^+. Les deux types parentaux se produiraient dans 90 pourcent des cas et les deux types recombinants dans 10 pourcent.
La descendance serait :

45% arg^-su indépendant de l'arginine
45% arg^+su^+ indépendant de l'arginine
5% arg^-su^+ dépendant de l'arginine
5% arg^+su indépendant de l'arginine

Chapitre 8

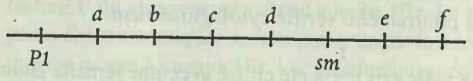
2. a. 27 pourcent
b. 36 pourcent

5. Une délétion s'est produite dans le bras gauche du chromosome 2, et leu^+, type parental *a* et un^+ ont été perdus.

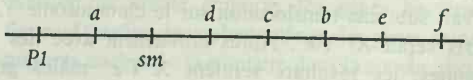
8. L'ordre est *bacedf*

Allèle	Bande
b	1
a	2
c	3
e	4
d	5
f	6

10. a. Dix-huit unités de cartographie ont été perdues ou inversées. Une longue inversion entraînerait la semistérilité alors qu'une grande délétion serait très probablement létale. C'est donc une inversion qui est la plus probable.
b. Normal



Inversion



Autre possibilité, *sm* pourrait être localisé extérieurement par rapport au locus *e* aussi bien sur le chromosome normal que sur le chromosome inversé.
c. La semistérilité résulte d'un crossing-over dans la région inversée. Tous les produits de crossing-overs devraient porter et des duplications et des inversions.

13. L'explication la plus probable est que l'un des points de rupture ou les deux soient localisés dans des gènes essentiels.

BROWN UNIVERSITY LIBRARY CENTRAL

20. a. L'inversion doit porter sur un segment de *b* à *x*.

b. Pour obtenir des descendants dans le cas d'une inversion, il faut qu'un double crossing-over se soit produit dans la région inversée ou que de simples crossing-overs soient survenus entre *f* et le point limite de l'inversion, situé quelque part entre *f* et *x*.

22. a. et **b.**

Classe 1 : parentale

Classe 2 : parentale

Classe 3 : double crossing-over (DCO) *y-cv* et *B-car*

Classe 4 : réciproque de la classe 3

Classe 5 : DCO *cv-v* et *v-f*

Classe 6 : réciproque de la classe 5

Classe 7 : DCO *cv-v* et *f-car*

Classe 8 : réciproque de la classe 7

Classe 9 : DCO *v-cv* et *v-f*

Classe 10 : réciproque de la classe 9

Classe 11 : Cette classe est identique au chromosome X du parent mâle et ne pourrait provenir du parent femelle. Chez *Drosophila* le sexe est déterminé par le rapport des chromosomes X au nombre de jeux d'autosomes. Chez les mâles ce rapport est 1X:2A, où A désigne les autosomes apportés par l'un des parents (chez les femelles le rapport est 2X:2A). Cette classe de mâles doit donc provenir de l'union d'un spermatozoïde porteur de X avec une cellule oeuf produite par non-disjonction de X et ne contenant donc que des autosomes.

c. La classe 11 ne devrait avoir qu'un seul chromosome sexuel, ce qui pourrait être vérifié cytologiquement.

32. a. Le mâle gris n°1 a été croisé avec une femelle jaune, croisement qui a donné des femelles jaunes et des mâles gris, soit une inversion de la liaison au sexe normale. Si l'allèle e^+ avait subi une translocation sur le chromosome Y, le mâle gris serait X^e Y-e^+. Après croisement avec des femelles jaunes, les résultats seraient X^eY-e^+ mâles gris X^eX^e femelles jaunes.

b. Le mâle gris n°2 a été croisé avec une femelle jaune, croisement qui a donné des mâles et des femelles gris ou jaunes en proportions égales. Si le X portant l'allèle e^+ l'avait perdu par translocation sur un autosome, la descendance serait comme suit, ou "A" désigne l'autosome impliqué dans la translocation et le signe "/" sépare les contributions mâles et femelles :

P $A^{e+}A/XYx$ AA/X^eX^e

F1 $A^{e+}X/AX^e$ femelle grise

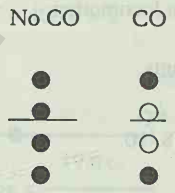
$A^{e+}Y/AX^e$ mâle gris

AX/AX^e femelle jaune

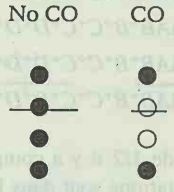
AY/AX^e mâle jaune

38. Le pourcentage de dégénérescence observé dans la descendance du rat exceptionnel dépasse de 51 pourcent ce qui est observé dans la descendance du rat normal. Une explication possible serait une inversion. Ceci pourrait être vérifié cytologiquement sur des cellules méiotiques. Une autre possibilité est une translocation, vérifiable de la même façon.

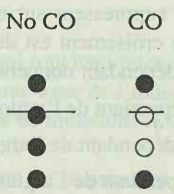
39. a. Des translocations réciproques à l'état hétérozygote mènent à la formation de duplications et d'inversions. Par conséquent, dans les asques où des crossing-overs se produisent au sein de la région déplacée, chaque crossing-over mènerait à deux ascospores blanches abortives et deux ascospores noires viables. Dans les asques sans crossing-over dans cette région, les ascospores seraient normales. On suppose une ségrégation alternée.



b. Des inversions péricentriques à l'état hétérozygote mènent à la formation de duplications et de délétions. Par conséquent, dans des asques où des crossing-overs se produisent au sein de la région inversée, chaque crossing-over mènerait à deux ascospores blanches abortives et deux ascospores noires viables. Dans les asques sans crossing-over dans cette région, les ascospores seraient normales. On suppose une ségrégation alternée.



c. Des inversions paracentriques à l'état hétérozygote mènent à la formation d'un fragment acentrique ayant perdu du matériel génétique (délétion) et d'un chromosome dicentrique ayant acquis du matériel supplémentaire (duplication), si un crossing-over se produit au sein même de l'inversion. Par conséquent, que se produisent ou ne se produisent pas de crossing-overs au sein de l'inversion, les conséquences seront les mêmes que dans les deux cas précédents.



40. L'espèce B est probablement l'espèce "parente". Une inversion paracentrique chez cette espèce produirait l'espèce D. L'espèce E serait alors produite par translocation de *zxy* sur *klm*. Ensuite, l'espèce A pourrait résulter d'une translocation de *abc* sur *def*. Finalement, l'espèce C résulterait d'une inversion péricentrique de *bcde*.

Chapitre 9.

1. a. Syndrome de Klinefelter mâle XXY

b. Syndrome de Down trisomie 21

c. Syndrome de Turner XO femelle

3. a. 3, 3, 3, 3, 33, 33, 0, 0

b. 7, 7, 7, 7, 8, 8, 6, 6,

5. b.

7. S'il n'y a pas de appariement entre chromosomes du même parent, toutes les paires sont *Aa*.

Les gamètes sont 1*AA* :2*Aa*:1*aa*. Suite à l'autofécondation, la descendance est 1/16 *AAAA*, 4/16 *AAAa*, 6/16 *Aaaa*, 4/16 *Aaaa* et 1/16 *aaaa*. En l'absence d'appariement entre chromosomes de parents différents, toutes les paires sont *AA* et *aa* et tous les gamètes *Aa*. 100% de la descendance sont donc *Aaaa*.

12. La cécité nocturne est une affection récessive liée à l'X, ce qui signifie que l'individu souffrant du syndrome de Turner a du obtenir son seul X de sa mère, et aucun chromosome sexuel de son père, ce qui indique un phénomène de non-disjonction chez celui-ci, soit à la méiose I ou à la méiose II.

17. a. Perte d'un X chez le foetus après le stade deux cellules.

b. Non-disjonction conduisant au syndrome de Klinefelter (XXY) suivi d'une non-disjonction dans une cellule pour le chromosome Y après le stade deux cellules, donnant lieu repectivement à XX et XXYY.

c. Non-disjonction de X au stade une cellule.

d. Soit fusion de zygotes XX et XY ou fertilisation d'un oeuf et du globule polaire par un spermatozoïde porteur du X et un autre porteur du Y, suivie de fusion.

e. Non-disjonction de X au stade deux cellules ou plus tard.

19. Type a: Le chromosome surnuméraire doit provenir de la mère. Puisque les chromosomes ne sont pas identiques, la non-disjonction a du se produire à la M_{II}.

Type b: Le chromosome surnuméraire doit provenir de la mère. Puisque les chromosomes ne sont pas identiques, la non-disjonction a du se produire à la M_{I}.

Type c: La mère a normalement transmis un chromosome alors que le père n'a pas transmis le chromosome 4. Donc, la non-disjonction s'est produite chez le mâle à l'une ou l'autre des méioses.

Type d: Une lignée cellulaire est sans apport maternel tandis que l'autre a un double apport maternel. Puisque les deux lignées sont complémentaires, la meilleure explication est à trouver dans une non-disjontion chez l'embryon au cours de la mitose.

Type e: chaque lignée est normale, et donc sans non-disjonction. La meilleure explication serait que le deuxième globule polaire ait été fertilisé et ensuite fusionné à l'embryon en cours de développement.

20. a. La descendance commune est be^+/be et b^+e/be

b. Le rare type femelle sauvage pourrait être du à un crossing-over donnant lieu à un gamète b^+e^+, mais pourrait aussi provenir d'une non-disjonction donnant lieu à un gamète be^+/b^+e. Un tel gamète pourrait donner lieu à une descendance viable.

c. La femelle est le produit d'une non-disjonction.

23. L'irradiation aurait pu causer des mutations ponctuelles ou induire la recombinaison, mais la non-disjonction est une explication plus plausible.

27. L'aneuploïdie est le résultat de la non-disjonction. Donc, tout système détectant la non-disjonction fera l'affaire. L'un des plus aisés consiste à croiser des femelles à yeux blancs avec des mâles à yeux rouges et d'observer les cas inverses de liaison à l'X dans la descendance. Comparez des populations exposées à des agents polluants à celles non-exposées.

Chapitre 10

1. Une souche Hfr contient le facteur de fertilité F intégré dans son chromosome. Dans une souche F^+, le facteur F est libre dans le cytoplasme. Une souche F^- ne contient pas de facteur de fertilité.

3. a. Pendant la conjugaison, les cellules Hfr tranfèrent les gènes de façon linéaire. Le transfert de gènes particuliers dépendra du Hfr considéré et de la durée du transfert. Une population de souches Hfr différentes donnera l'impression de transférer des gènes de façon quasi aléatoire. Un parallèle peut être trouvé avec la transduction généralisée dans laquelle une quantité déterminée d'ADN plutöt que des gènes spécifiques se trouve encapsidée dans une enveloppe virale.

La transduction généralisée permet de transférer n'importe quel gène.

b. Les facteurs F' proviennent de l'excision incorrecte d'un facteur F du chromosome d'une souche Hfr. Ils portent des gènes chromosomiques spécifiques puisque le site d'intégration est propre à chaque Hfr. La transduction spécialisée ressemble à ce phénomène puisque l'ADN viral est intégré dans une région spécifique du chromosome bactérien et que son excision incorrecte emporte des gènes bactériens spécifiques. Dans les deux phénomènes, les gènes transférés sont présents en double exemplaire dans la souche réceptrice.

6.

M Z X W C
W C N A L
A L B R U
B R U M Z

Les régions soulignées sont identiques. La seule interprétation possible est que le matériel génétique est circulaire, avec des facteurs F insérés à des endroits différents selon les souches. L'ordre des gènes sur la carte circulaire est MZXWCNALBRUMZ.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

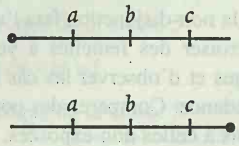
7. Les souches 2, 3 et 7 sont F^-. Les souches 1 et 8 sont F^+ et les souches 4, 5 et 6 sont Hfr.

10. a. L'ordre des gènes est *arg bio leu*.

b. La distance *arg* - *bio* est de 12,76 U.C. La distance *bio* - *leu* est de 2,12 U.C.

12. *pro*–4–5–7–1–6–3–2–8–*ade*

13. La méthode la plus directe consisterait à placer une origine d'Hfr à chaque extrémité de la région considérée et de mesurer le temps séparant le transfert de deux gènes spécifiques. Par exemple,



15. La meilleure explication est que le gène pro^+ s'est trouvé sur un facteur F' dans une partie des cellules qui l'ont donc transféré rapidement. Les cellules réceptices de ce premier croisement contiennent donc un facteur F (en fait, F'pro^+) qu'elles pourront à leur tour transmettre lors du second croisement.

16. Le taux élevé d'intégration et la préférence vis-à-vis du site occupé originellement par le facteur F suggèrent que le F' présente une homologie avec le site initial. La région homologue pourrait être un fragment du facteur F ou un fragment d'origine chromosomique.

21. Le nombre attendu de doubles recombinants est 2. L'interférence est de -1,5. Par définition, l'interférence est négative

24. La majorité des transduits gal^+ sont des mérodiploïdes et ils ont tendance à perdre un gène *gal*. Si le gène gal^+ est perdu, un clone gal^- se développera. Les transduits stables ne sont pas des diploïdes partiels et n'ont dès lors pas tendance à ségréger des gal^-. S'ils ne sont pas diploïdes partiels, c'est parce qu'il y a eu un échange entre les allèles *gal* plutôt que l'insertion d'un second allèle *gal* comme dans les mérodiploïdes. Cet échange s'est produit par bouclage et excision de lambda avec reconstitution d'un allèle gal^+.

25. a. C'est la transduction spécialisée qui est à l'oeuvre. Elle se caractérise par la transduction d'un nombre limité de marqueurs.

b. Le prophage est localisé dans la région *cys-leu*, qui est la seule pour laquelle des colonies sont observées sur les milieux sélectifs.

28. Les cellules qui poussent sur BCE ont dû recevoir a^+ et d^+. Les colonies qui poussent sur ABD ont reçu c^+ et e^+. L'ordre est *d-a-e-c*. Remarquez que *b* n'est jamais cotransduit et se trouve donc éloigné de ce groupe de gènes.

30. a. Les colonies sont toutes cys^+ et sont + ou – pour les deux autres gènes.

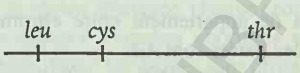
b. (a) $cys^+\ leu^+\ thr^{+/-}$

(b) $cys^+\ leu^{+/-}\ thr^+$

(c) $cys^+\ leu^+\ thr^+$

c. Aucune colonie ne pousse sur milieu minimum. Aucun recombinant thr^+leu^+ n'est formé. Les colonies qui poussent sur le milieu (1) sont $cys^+leu^+thr^-$ et celles qui poussent sur (2) sont $cys^+leu^-thr^+$. Le reste des colonies cys^+ doit être $cys^+leu^-thr^-$ et ce génotype est présent dans 100%–56%–5% = 39% des colonies.

d.



Chapitre 11

1. La double hélice d'ADN comporte deux types de liaisons, des liaisons covalentes et des liaisons hydrogène. Les liaisons covalentes interviennent dans chacun des brins de l'ADN et lient fortement entre eux les nucléotides, les sucres et les groupements phosphates (dans chaque composant et entre les composants). Les liaisons hydrogène se forment entre les deux brins et impliquent un nucléotide d'un brin avec un nucléotide de l'autre brin dans un appariement complémentaire. Individuellement, ces liaisons hydrogène sont faibles mais, collectivement, elles sont très fortes.

3. Une amorce est un court fragment d'ARN qui est synthétisé par l'ARN polymérase au cours de la réplication de l'ADN en utilisant l'ADN comme matrice. Une fois l'amorce synthétisée, l'ADN polymérase ajoute de l'ADN à l'extrémité 3' de l'ARN. Les amorces sont nécessaires parce que l'ADN polymérase principale impliquée dans la réplication de l'ADN est incapable d'entamer la synthèse de l'ADN et exige une extrémité 3'. L'ARN est ensuite éliminé et remplacé par de l'ADN de manière à éviter la présence de trous dans le produit final obtenu.

5. Etant donné que l'ADN polymérase n'est capable d'ajouter de nouveaux nucléotides qu'à l'extrémité 3' d'un brin d'ADN et étant donné aussi que les deux brins sont antiparallèles, au moins deux molécules d'ADN polymérase doivent être impliquées dans la réplication de toute région spécifique de l'ADN. Lorsqu'une région devient à simple brin, les deux brins ont des orientations opposées. Imaginons une région à simple brin qui sétend de la gauche vers la droite. A l'extrémité gauche, l'extrémité 3' d'un brin pointe vers la droite et la synthèse peut débuter et se poursuivre en direction de l'extrémité droite de cette région. L'autre brin possède une extrémité 5' pointant vers la droite et la synthèse ne peut pas commencer et se poursuivre vers l'extrémité droite de la région à simple brin à l'extrémité 5'. Au contraire, la synthèse doit débuter quelque part à droite de l'extrémité gauche de la région à simple brin et progresser vers l'extrémité gauche de la région. Tandis que la synthèse du premier brin se poursuit (synthèse continue), la région à simple brin s'allonge vers la droite. Ceci laisse le second brin non-répliqué dans cette région à simple brin et il faut une nouvelle initiation de la synthèse de l'ADN qui progresse de l'actuelle extrémité droite de la région à simple brin vers le premier point d'initiation sur ce brin. Ceci conduit à une synthèse discontinue le long de ce brin.

7. G = C = 24%, A = T = 26%.

9. Les résultats suggèrent que l'ADN est répliqué sous forme de courts fragments qui sont ensuite réunis sous l'action d'une enzyme, l'ADN ligase. Etant donné que la réplication de l'ADN est bidirectionnelle et qu'il existe de multiples points le long de l'ADN où la réplication est initiée et étant donné en outre que les ADN polymérases ne fonctionnent que dans la direction 5'→3', un des brins de l'ADN se trouve toujours dans la mauvaise orientation. C'est pourquoi une synthèse par fragments est nécessaire.

12. Les règles de Chargaff prévoient que A = T et G = C. Puisque ce n'est pas le cas ici, l'interprétation la plus plausible est qu'il s'agit d'ADN à simple brin. Le phage aurait à synthétiser le brin complémentaire avant de commencer à produire des copies multiples de lui même.

13. Souvenez-vous qu'il y a deux liaisons hydrogène entre A et T, tandis qu'il y en a trois entre G et C. La dénaturation implique la rupture de ces liaisons, ce qui exige de l'énergie. Plus il y a de liaisons à rompre, plus il faut fournir d'énergie. La température à laquelle une molécule donnée d'ADN se dénature est donc fonction de sa composition en bases. Plus la température de dénaturation est élevée, plus le pourcentage de paires de G–C est élevé.

18. Les données suggèrent que chaque chromosome est composé d'une seule longue molécule continue d'ADN et que les chromosomes sont fragmentés au cours de la translocation.

Chapitre 12

1. La structure primaire d'une protéine est la séquence de ses acides aminés qui sont tenus ensemble par des liaisons covalentes. La structure secondaire des protéines est liée à la formation de liaisons hydrogène entre les groupements CO et NH des différents acides aminés. Souvent, la formation d'hélices α et de feuillets β en résulte. La structure primaire d'une protéine correspond à la formation de liaisons électrostatiques, hydrogène et de Van der Waals entre les groupements R des acides aminés. Lorsque la protéine fonctionnelle formée est composée de plus d'un polypeptide, la protéine possède une structure quaternaire.

3. Un mutant auxotrophe est une souche qui exige pour sa croissance au moins un nutriment en plus de ceux qui sont normalement nécessaires pour cet organisme.

5. Yanofsky a analysé des mutations du gène *trpA* et les a ordonnées en se servant de la transduction. Il a aussi déterminé la séquence d'acides aminés des produits altérés du gène. De cette manière, il a montré une corrélation précise entre la séquence des sites mutés et celle des acides aminés altérés.

7.

	B	K
rII	Grandes plages	Pas de plages
rII^+	Petites plages	Plages

9. Le lactose est composé d'une molécule de galactose et d'une molécule de glucose. Un traitement secondaire consisterait à éliminer tout galactose et tout lactose du régime alimentaire. On ne s'attend pas à ce que cette maladie soit dominante parce qu'une copie normale du gène devrait suffire à dégrader au moins une partie, sinon tout le galactose. En fait, la maladie est récessive.

11. a. L'utilisation principale est la détection des parents porteurs de la maladie et son pronostic chez le fœtus.

b. Etant donné que les valeurs obtenues pour les individus normaux et pour les porteurs se chevauchent en ce qui concerne la galactosémie, il existe une ambiguïté lorsqu'une personne présente une valeur comprise entre 25 et 30 unités. Cette personne pourrait être porteuse ou normale.

c. Ces gènes de type sauvage sont phénotypiquement dominants mais sont incomplètement dominants au niveau moléculaires. Un niveau minimum d'activité enzymatique est apparemment suffisant pour assurer une fonction et un phénotype normaux.

12. Une explication moins plausible serait qu'il s'agisse d'une mutation germinale. Il serait par contre plus vraisemblable que chaque parent possède un bloc dans une étape différente d'une même voie métabolique. Si l'un était *AAbb* et l'autre *aaBB*, l'enfant aurait un génotype *AaBb* et aurait des niveaux suffisants des deux enzymes pour la production du pigment.

14. a. Le terme complémentation se réfère à des gènes dans une cellule, ce qui n'est pas le cas ici. Ce qui se passe vraisemblablement, c'est un effet de nutrition croisée (cross-feeding) dans lequel une substance produite par une souche diffuse vers une autre souche et permet sa croissance. C'est donc équivalent à l'addition de cette substance au milieu de culture. Le fait qu'un cross-feeding semble avoir lieu suggère que les souches sont bloquées à des points différents du trajet métabolique.

b. Pour qu'un cross-feeding se produise, il faut que la souche en croissance possède un bloc à une étape située plus tôt dans la chaîne métabolique que le bloc de la souche dont elle reçoit la substance permettant la croissance.

c. E – D – B

d. Sans tryptophane du tout, il n'y aurait aucune croissance et les cellules n'auraient pas vécu assez longtemps pour synthétiser un produit capable de diffuser.

18. a. 60 pour cent des méioses ne feront pas intervenir de crossing-over.

b. 20 u.c. séparent les deux gènes.

c. 10 pour cent.

d. $\longrightarrow$ B $\longrightarrow$ A $\longrightarrow$ valine
val-1 *val-2*

20. a. Blanc

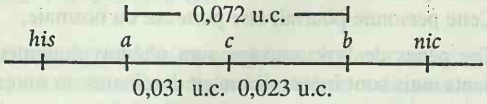
b. Bleu

c. Pourpre

d. P *bbDD* X *BBdd*
F_1 *BbDd* X *BbDd*
F_2 9 *B-D-* (pourpre)
3 *bbD-* (blanc)
3 *B-dd* (bleu)
1 *bbdd* (blanc) ou 9 : 3 : 4

21. Les nombres moyens de particules de phages produites par bactérie («burst size ») devraient être les mêmes pour les configurations cis et trans si les mutations sont dans des cistrons différents, tandis que si elles sont dans les mêmes cistrons, ces nombres devraient être zéro. C'est pourquoi, supposant que *rV* est dans A, *rW* sera aussi dans A mais *rU*, *rX*, *rY* et *rZ* seront en B.

28.



29. a. L'allèle s^n se montrera dominant vis-à-vis de s^f parce qu'il n'y aura que 40 unités de facteur carré dans l'hétérozygote.

b. Ici, l'allèle fonctionnel est récessif.

c. Avec le temps, l'allèle s^f peut devenir dominant de deux manière : (1) il peut muter partiellement de manière à produire plus de 50 unités, ou (2) d'autres gènes peuvent muter pour augmenter la production de s^f.

30. 129,15

33. a. Il y a trois cistrons :

Cistron 1 : mutants 1, 3 et 4

Cistron 2 : mutants 2 et 5

Cistron 3 : mutant 6

b. L'ordre est *A* / *a* 6 (1,3,4) (2,5) *B* / *b*

Chapitre 13

1. Puisque des ARN peuvent s'hybrider aux deux brins, les ARN doivent être synthétisés à partir des deux brins. Mais ceci ne signifie pas que les deux brins servent de matrice *dans chaque gène*. Un seul brin est utilisé par gène mais des gènes différents peuvent être transcrits dans des directions différentes le long de l'ADN. Le test le plus direct serait de purifier un ARN spécifique codant pour une protéine spécifique et ensuite de l'hybrider au génome de λ. Un seul brin devrait s'hybrider à l'ARN purifié.

3. Le changement d'un seul nucléotide devrait aboutir au changement de trois acides aminés adjacents dans une protéine. Les changements d'un seul ou de deux acides aminés devraient se produire beaucoup plus rarement que le changement de trois. Ceci est exactement l'inverse de ce qu'on observe généralement dans les protéines.

7. Le codon pour ambre est UAG. Les différents acides aminés qui auraient dû être insérés pour poursuivre la chaîne sauvage, ainsi que leurs codons respectifs, sont énumérés ci-dessous :

glutamine	CAA, CAG*
lysine	AAA, AAG*
acide glutamique	GAA, GAG*
tyrosine	UAU*,UAC*
tryptophane	UGG*
sérine	AGU, AGC, UCU, UCC, UCA, UCG*

Dans chaque cas, les codons qui ne requièrent qu'un seul changement de base pour devenir un UAG sont indiqués par un astérisque.

8. a. 1/8

b. 1/4

c. 1/8

d. 1/8

10. a. $(GAU)_n$ code pour Asp (GAU), Met (AUG) et stop (UGA). $(GUA)_n$ code pour Val (GUA), Ser (AGU) et stop (UAG). Un cadre de lecture contient un codon stop.

b. Chacun des cadres de lecture contient un codon stop.

11. Mutant 1 : La substitution d'une Ser par une Arg a eu lieu, suggérant le changement d'un nucléotide. Deux des codons pour Arg sont AGA et AGG et un des codons pour Ser est AGU. Le U final de Ser pourrait avoir été remplacé par A ou G.

Mutant 2 : Le codon Trp (UGG) a été changé en un codon stop (UGA ou UAG).

Mutant 3 : Deux mutations de déphasage ont été produites :

5' GCN CCN (–U) GGA GUG AAA AA(+U ou C) UGU/C CAU/C 3'

Mutant 4 : Une inversion a eu lieu après le Trp et avant Cys. La séquence originale de l'ADN était :

3' CGN GGN ACC TCA CTT TTT ACA/G GTA/G 5'

Dès lors, la séquence d'ARN complémentaire était :

5' GCN CCN UGG AGU GAA AAA UGU/C CAU/C 3'

La séquence d'ADN est devenue la suivante après inversion :

3' CGN GGN AC C AAA AAG TG A ACA/G GTA/G 5'

Donc la séquence d'ARN complémentaire était :

5' GCN CCN UG G UUU UUC AC U UGU/C CAU/C 3'

12. a. –

ancien : AAA/G AGU CCA UCA CUU AAU GCN GCN AAA/G

nouveau : AAA/G GUC CAU CAC UUA AUG GCN GCN AAA/G

+

b. Plus (+) et moins (-) sont indiqués sur les brins appropriés.

14. 3' CGT ACC ACT GCA 5'

5' GCA TGG TGA CGT 3'

5' GCA UGG UGA CGU 3'

3' CGU ACC ACU GCA 5'

NH_2-Ala-Trp stop Arg

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

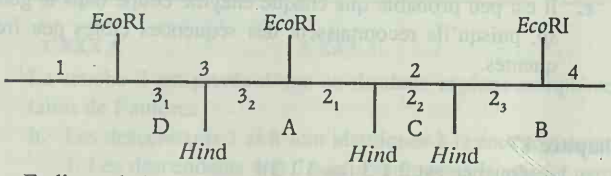
16. f, d, j, e, c, i, b, h, a, g

17. Les cellules de cultures établies depuis longtemps ne sont en général plus toutes diploïdes. Pour des raisons actuellement inconnues, l'adaptation à la culture entraîne fréquemment des changements de caryotypes et de dosages de gènes. Ceci pourrait causer une hémizygotie pour certains gènes qui permettrait l'expression de certains allèles récessifs masqués auparavant.

Chapitre 14

2. GTTAAC est rencontré en moyenne toutes les 4^6 bases, c'est-à-dire toutes les 4,096 kb. GGCC est rencontré en moyenne toutes les 4^4 bases, c'est-à-dire toutes les 0,256 kb.

4.



6. En lisant de bas en haut, la séquence est:

*Hind-Hae-Hae-Hind-Hae-Hae-Hae-Hind-Hind-Hae-Hind-Hae-Eco*RI

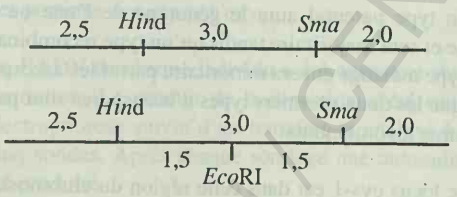
7. En lisant de bas en haut,

Colonne de gauche : GGTACAACTATATATCAATTATAAC

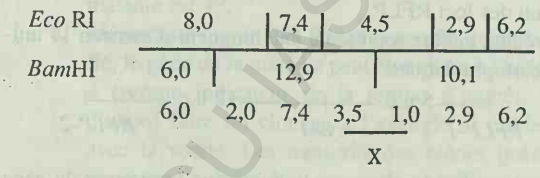
Colonne de droite : GGATCTATTCTTATGATTATATAG

9. *Alu*I $(1/4)^4$ = toutes les 256 paires de nucléotides
*Eco*RI $(1/4)^6$ = toutes les 4096 paires de nucléotides
*Acy*I $(1/4)^4(1/2)^2$ = toutes les 1024 paires de nucléotides

10.a.



18. a. et b.



Chapitre 15

2. L'électrophorèse en champs alternés s'applique à des fragments d'ADN de la taille d'un chromosome. A moins que la taille globale d'un chromosome soit changée, il migrera toujours de la même façon dans un gel dans des conditions d'électrophorèse équivalentes.

a. 7 bandes semblables à celles du type sauvage.
b. 7 bandes semblables à celles du type sauvage.
c. la plus grande et la plus petite des bandes disparaîtront et seront remplacées par deux bandes de taille intermédiaire, à moins que l'une d'entre elles (ou les deux) ne migrent comme une des autres bandes.
d. Une bande serait plus grande que la bande sauvage correspondante et une autre plus petite.
e. 7 bandes semblables à celles du type sauvage.
f. 7 bandes.
g. la plus grandes des bandes du type sauvage serait remplacée par une bande de plus grande taille.

6. Une approche serait d'inactiver le gène sauvage («gene knock-out») puis d'observer le phénotype résultant. Pour cela, il faut suivre le protocole décrit dans la figure 15-13: insérer un gène sélectionnable dans le gène étudié cloné, linéariser le plasmide et l'introduire par transformation dans la levure. Une autre approche possible est la mutagénèse dirigée.

7. Après électrophorèse, faire un transfert Southern du gel et le sonder avec le gène cloné marqué à la radioactivité.

9. a. Soit B = queue tordue, b = queue normale, r_1= 3,8 kb, et r_2= 1,7 kb. Le croisement est $Bb\ r_1r_2$ X $bb\ r_1r_1$
Parmi la descendance à queue tordue, il y a

40% $Bb\ r_1r_1$
60% $Bb\ r_1r_2$

Si on ne prend pas en considération la contribution du parent sauvage, la descendance est

40% $B\ r_1$
60% $B\ r_2$

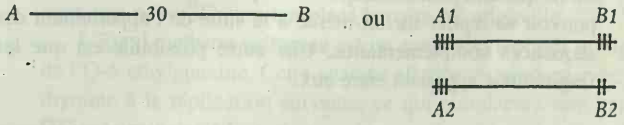
Dans le cas d'un assortiment indépendant, on devrait observer un rapport $r_1 : r_2$ de 1::1. Il est clair que r_1 et r_2 ne ségrègent pas de façon indépendante. Les deux gènes sont donc liés et séparés par 40 u.c.

b. Le croisement original est $B\ r_2 / b\ r_1$ X $b\ r_1 / b\ r_1$. La descendance sauvage pour l'aspect de la queue est

60% $b\ r_1 / b\ r_1$
40% $b\ r_2 / b\ r_1$

10. a. 1: *A1, B2*, recombinant
2: *A2, B1*, recombinant
3: *A1,B1*, parental
4: *A2,B2*, parental

b.



12. a. Rappelez-vous que les plasmides vecteurs de levure peuvent se trouver à l'état libre dans le noyau, sous forme de copies multiples qui ségrègent de façon aléatoire dans les cellules filles ou s'intègrent dans les chromosomes et ségrègent comme n'importe quels autres gènes de levure à la mitose et à la méiose.

BCU LAUSANNE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

YP1 produit 100% de descendants *leu*$^+$, ce qui suggère que le gène *leu*$^+$ n'est pas intégré dans un chromosome et qu'il existe suffisamment de copies du plasmide pour que toute la descendance hérite d'au moins un exemplaire.

YP2 produit 50% de descendants *leu*$^+$, ce qui indique une ségrégation selon un profil ordonné et suggère que le gène *leu*$^+$ est intégré dans un des chromosomes de la levure.

b. L'insert qui n'est pas coupé par l'enzyme porte le gène *leu*$^+$.

Après restriction, électrophorèse et transfert, la sonde révèlera une bande provenant de YP1, qui sera un peu plus «lourde» que le plasmide sans insert (elle migrera moins loin que le plasmide vecteur pendant l'électrophorèse). YP2 produira deux bandes contenant chacune un partie du plasmide intégré plus de l'ADN génomique. La position de ces bandes par rapport à celle du plasmide vecteur est imprévisible.

Chapitre 16

1. a. F2 fait partie du groupe d'hommes qui pourraient être le père de l'enfant en question.

b. Si l'on numérote les bandes présentes chez l'enfant de haut en bas, il y en a 22. Les bandes d'origine maternelle sont : 1, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 et 21. Les autres bandes proviennent du père.

c. Non

d. Une mutation a modifié, éliminé ou créé un site de restriction.

e. L'ADN cellulaire est coupé par une enzyme de restriction et soumis à une électrophorèse. Cela produit une traînée continue d'ADN sur toute la longueur du gel. Des bandes discrètes sont révélées parce que la sonde ne détecte que les séquences qui lui sont complémentaires. L'apparition de bandes multiples résulte de la distance variable entre un site de restriction et la séquence répétée la plus proche : la sonde ne s'hybride qu'à une sous-région de l'ADN présent dans chaque bande .

3. a. Un locus serait mis en évidence sur chacun des chromosomes d'une paire d'homologues.

b. Les deux extrémités de chaque chromatide seraient mises en évidence.

c. L'ADN satellite de tous les chromosomes associés à des organisateurs nucléolaires serait mis en évidence.

d. De nombreuses régions courtes de nombreux chromosomes seraient mises en évidence.

e. Les centromères, les télomères et les organisateurs nucléolaires seraient mis en evidence.

4. Chaque fragment d'ADN contient en moyenne deux séquences SINE qui sont palindromiques. Chaque fragment d'ADN devrait pouvoir se replier sur lui-même à la suite de l'appariement des séquences complémentaires. Une autre possibilité est que les fragments s'apparient entre eux.

5. a. Le profil du suspect 1 le place dans le groupe des personnes susceptibles d'avoir commis le viol.

b. Les suspects 2 et 3 ne peuvent pas avoir commis le viol.

8. a. Isoler l'ADN, le couper avec une enzyme de restriction et séparer les fragments par électrophorèse. Sonder un transfert de type Southern avec des séquences du transposon marquées à la radioactivité.

b. Vous pourriez rechercher une corrélation entre l'élimination ou l'inactivation du transposon et la disparition du phénotype anormal.

c. Le transposon pourrait s'être inséré dans des gènes non essentiels ou dans de l'ADN espaceur.

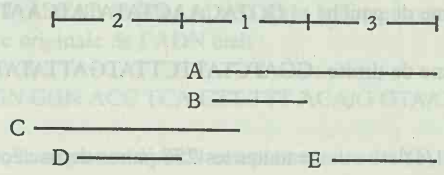
10. a. et **b.** Une explication serait que le gène est encadré de répétitions de séquences et que la sonde contenait au moins une partie de cette répétition. Une autre possibilité serait que le locus *sp* contienne une famille de gènes. Bien que les trois enzymes de restriction utilisées génèrent de multiples fragments différents, la séquence répétée, ou la famille de gènes *sp*, est répartie sur au moins quatre régions différentes du locus qui, dans chaque cas, ont été séparées par les coupures enzymatiques, générant ainsi quatre bandes.

c. Il est peu probable que chaque enzyme coupe dans le gène *sp*, puisqu'ils reconnaissent des séquences cibles peu fréquentes.

Chapitre 17

1. a. La séquence est 2 1 3 (ou 3 1 2).

b. Le YAC A comporte au moins une portion des régions 1 et 3. Le YAC B est dans la région 1. Le YAC C couvre au moins une portion des régions 1 et 2. Le YAC D contient la région 2. Le YAC E contient la région 3. Un schéma de ces résultats est présenté ci-dessous. Il n'est pas possible d'y indiquer les localisations exactes des extrémités de chacun des YAC.



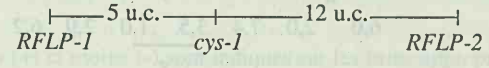
3. Le croisement est

cys-1 RFLP-1^O *RFLP-2*^{O} X *cys-1*$^+$ *RFLP-1*^{M} *RFLP-2*^{M}

Un type parental aura le génotype de l'une ou de l'autre souche et sera majoritaire tandis qu'un type recombinant aura un génotype mélangé et sera minoritaire parmi les ascospores. Il est clair que les deux premiers types d'ascospores sont parentaux et les autres recombinants.

a. Le locus cys-1 est dans cette région du chromosome 5. S'il n'était pas dans cette région, on n'observerait de liaison avec aucun des loci RFLP.

b. La région entière représente une longueur d'environ 17 unités cartographiques.

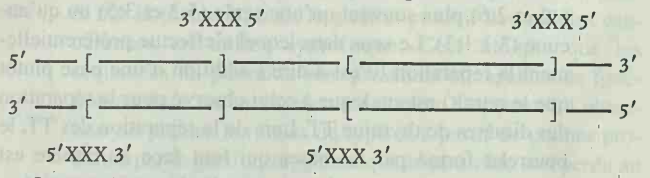


c. Une étape appropriée pour la poursuite du clonage du gène *cys-1* consisterait à utiliser l'électrophorèse sur gel en champs alternés pour préparer un échantillon de chromosome 5 purifié et ensuite à cloner des fragments de chromosome. Les clones pourraient être criblés à l'aide de sondes de RFLP.

5. Souvenez-vous qu'un gène n'est qu'une courte région d'un long brin d'ADN et que dans des conditions normales un gène cloné contiendra la séquence entière du gène. S'il y a deux coupures

dans un gène, trois fragments seront produits qui interagiront tous avec la sonde, comme on le voit pour l'enzyme 1. Les coupures externes au gène ne produiront qu'un seul fragment qui interagira avec la sonde, ce que nous voyons pour l'enzyme 2. Une seule coupure dans un gène produira deux fragments qui interagiront avec la sonde, comme on le voit pour l'enzyme 3.

8. a. Les RAPD sont encadrés par deux copies inversées de la séquence d'une amorce. Ci-dessous l'amorce est représentée par des X et les régions amplifiées apparaissent entre crochets. Pour la facilité, les deux régions amplifiées sont placées sur le même segment d'ADN pour la souche 1.



La souche 2 est privée d'une ou de deux régions complémentaires de l'amorce.

b. Les descendants 1 et 6 sont identiques à la souche parentale 1. Les descendants 4 et 7 sont identiques à la souche parentale 2. Les descendants 2 et 5 ont reçu le chromosome porteur de la bande supérieure du parent 1 et le chromosome porteur de la bande inférieure du parent 2 (avec pour résultat l'absence de deuxième bande) Le descendant 3 a reçu l'inverse : le chromosome porteur de la bande inférieure de la souche 1 et le chromosome porteur de la bande supérieure de la souche 2 (avec pour résultat l'absence de deuxième bande). Les bandes 1 et 2 ne sont donc pas liées.

c. Souvenez-vous qu'un ditype non-parental ne comporte que deux types, tous deux recombinants. Dès lors, la tétrade serait composée de quatre descendants tels que le descendant 2 et quatre descendants tels que le descendant 3.

9. a. Le gène *x* est localisé dans la région 5.

b. Le gène *y* est localisé dans la région 8.

c. Les deux sondes sont capables de s'hybrider avec le cosmide E étant donné qu'il est suffisamment long pour contenir des portions des gènes *x* et *y*.

13. a. De l'ADN de chaque individu a été obtenu et soumis à une restriction. Le produit de la digestion a été soumis à une électrophorèse suivie d'un transfert et analysé à l'aide des cinq sondes. Aprés chaque sondage une autoradiographie a été produite.

b. Le locus RFLP le plus proche de l'allèle correspondant à la maladie est 4°.

c. Maintenant que le RFLP le plus proche du gène a été identifié, le gène de la maladie peut être cloné à l'aide de la sonde 4 comme indicateur de la région d'intérêt. On pourrait d'abord faire un clonage à l'aveugle et cribler les clones avec la sonde. Les transcrits des clones positifs pour 4° pourraient ensuite être comparés et utilisés pour pêcher la région d'ADN contenant le gène d'intérêt. Enfin le séquençage de l'ADN pourrait être effectué et les mutations provoquant la maladie être identifiées.

Chapitre 18

2. Les opérateurs des mutants O^c ne peuvent pas lier le répresseur, produit du gène I, et, dès lors, les opérons *lac* associés à des opérateurs O^c ne peuvent pas être mis à l'arrêt. Etant donné qu'un opérateur ne contrôle que les gènes qui se trouvent sur le même brin d'ADN, il est en *cis* (sur le même brin) et dominant (ne peut pas être arrêté).

7. Les mutants Z^- non-polaires ne peuvent pas convertir le lactose en allolactose, et l'opéron n'est donc jamais induit.

9. Dans le cas d'un contrôle négatif, la transcription d'un opéron est arrêtée par un médiateur et ce médiateur doit être enlevé pour permettre la transcription. Dans le cas d'un contrôle positif, l'expression de l'opéron est mise en route par le médiateur et celui-ci doit être présent pour que la transcription ait lieu.

10. Le gène *lacY* produit une perméase qui transporte le lactose dans la cellule. Un mutant *lacY*$^-$ ne pouvant pas transporter le lactose dans la cellule, la β–galactosidase ne sera pas induite.

12. L'opéron bactérien comporte une région promoteur qui s'étend jusqu'à environ 35 bases en amont du site où la transcription est initiée. C'est dans cette région que se trouve le promoteur. Les activateurs et les répresseurs, qui sont des protéines opérant en *trans* se liant à la région du promoteur, contrôlent uniquement la transcription de cistrons situés en *cis* par rapport à ce promoteur.

Les cistrons eucaryotiques ont la même organisation de base. Toutefois la région promoteur est plus longue et des amplificateurs (enhancers) localisés plusieurs milliers de nucléotides en amont ou en aval du promoteur peuvent influencer la fréquence de transcription. Une différence majeure est qu'on n'a pas mis de messagers polycistroniques en évidence chez les eucaryotes.

Chapitre 19

5. a. La dépurination consiste en l'élimination de l'adénine ou de la guanine d'un nucléotide. Ce site apurinique ne peut guider l'ADN polymérase pour l'insertion de la base complémentaire. La réplication s'en trouve bloquée. Dans certaines conditions, la réplication se poursuit par l'insertion d'une base au hasard en face du site apurinique. Trois insertions sur quatre provoqueront alors une mutation.

b. La désamination d'une cytosine produit un uracile. Si cet uracile n'est pas "réparé", ce sera une adénine qui sera insérée en face de l'uracile dans la fibre d'ADN nouvellement synthétisée, ce qui constituera une mutation de transition.

6. Le 5-Bromouracile est un analogue de la thymine. Il subit la transition de tautomérie avec une plus haute fréquence que la thymine et la probabilité qu'il s'apparie avec G lors de la réplication est proportionellement plus grande. Lors du cycle de réplication suivant, une paire GC aura remplacé la paire AT originelle.

L'Ethyl methane sulfonate est un agent alkylant qui produit de l'O-6-ethylguanine. Cette guanine alkylée s'appariera avec la thymine à la réplication suivante, ce qui remplacera une paire GC par une paire AT.

8. a. La réparation des défauts d'appariement intervient lorsqu'un nucléotide mal apparié est incorporé pendant la réplication. La base incorrecte est excisée et la base correcte est introduite à sa place. Les enzymes de ce système distinguent le brin d'ADN néosynthétisé du brin ancien parce que, chez *E. coli*, ce dernier est méthylé.

PUBLISHED BY THE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

b. La réparation par recombinaison s'effectue lorsque des sites AP et des photodimères UV bloquent la réplication (une brèche est formée dans le brin néosynthétisé, en regard de la lésion). La recombinaison comble cette brèche avec le segment correspondant de la molécule soeur d'ADN (l'autre branche de la fourche de réplication) qui contient deux brins normaux. Ceci produit une molécule d'ADN contenant une brèche monocaténaire en regard d'un brin normal, qui est réparée de la façon habituelle, et une molécule contenant un photodimère ou un site AP en regard d'un brin correct.

9. Une mutation bradytrophe est une mutation qui altère une protéine en la laissant partiellement fonctionnelle. La fonction enzymatique de la protéine peut par exemple être réduite et non éliminée.

11. a. Etant donné que le codon 5'-UAA-3' ne contient ni G ni C, il n'est pas possible de faire apparaître un triplet UAA par traitement avec un agent qui provoque des transitions vers une paire GC. Les codons qui correspondent aux triplets UGA et UAG sur la fibre anti-sens d'ADN sont 3'-ACT-5' et 3'-ATC-5'. Une transition vers ces séquences peut se produire à partir du codon 3'-ATT-5'. Mais celui-ci correspond sur l'ARN à un triplet UAA qui est lui-même un codon stop.

b. Oui. Un exemple pourrait être 3'-UGG-5' qui code pour le tryptophane, vers 5'-UAG-3'.

c. Non. Dans ces codons stop, la seule base sur laquelle on pourrait agir est le G (par exemple dans UAG). En remplaçant un G par un A on ne ferait que remplacer un codon stop par un autre.

13. Pour comprendre ces résultats rappelez-vous que la moitié de la descendance doit provenir du parent de type sauvage.

a. L'absence de révertants suggère la présence d'une délétion ou d'une inversion dans le gène.

b. *Prototrophe A*: étant donné que 100% des descendants sont prototrophes, il s'agit sans doute d'une réversion au site de la mutation de départ.

Prototrophe B: la moitié des descendants sont des prototrophes parentaux. Les autres (28%) résultent de l'apparition d'une nouvelle mutation. Notez que 28% est à peu près égal aux 22% d'auxotrophes. On pourrait donc suggérer qu'une mutation suppresseur non liée est apparue qui ségrège de manière indépendante du mutant *nic*.

Prototrophe C: il y a 496 "révertants" prototrophes (les 500 autres sont des prototrophes parentaux) et quatre auxotrophes. Ceci suggère qu'une mutation suppresseur s'est produite à un site très proche de la mutation de départ (100%[4X2]/1000 = 0,8 u.c.).

Chapitre 20

1. 3, 4, 6.

5. Remarquez d'abord qu'une conversion génique se produit. Dans le premier croisement, c'est a_1 qui est converti (1:3). Dans le deuxième et le troisième croisements, a_3 est converti. Un phénomène de polarité se produit manifestement. Les résultats peuvent s'expliquer par la carte ci-dessous, à condition que l'ADN hybride vienne exclusivement à partir de la gauche.

$$a_3 \text{——} a_1 \text{——} a_2$$

7. Les rapports sont de 3:1 pour a_1 et pour a_2. Il n'y a pas d'indication de polarité, ce qui indique que la conversion génique s'effectue dans le cadre de la recombinaison. L'explication la plus plausible est que deux événements distincts d'excision suivie de réparation se produisent et que dans chacun des cas, c'est la séquence mutante qui est conservée plutôt que la séquence de type sauvage.

8. a et **b.** Une molécule hétéroduplex qui contient un nombre différent de bases dans chacun de ses brins présente une distorsion plus importante que celle qui résulte d'un seul défaut d'appariement. Par conséquent, le premier cas a plus de chances d'être réparé que le second. Dans le cas présent, les deux molécules hétéroduplex sont réparées (ce qui mène à 6:2 et 2:6) plus souvent qu'une seule (5:3 et 3:5) ou qu'aucune (3:1:1:3). Le sens dans lequel s'effectue préférentiellement la réparation (c'est-à-dire l'addition d'une base plutôt que le retrait) est analogue à celui observé pour la réparation des dimères de thymine TT. Lors de la réparation des TT, le bourrelet formé par les bases qui font face au dimère est considéré comme normal et c'est le dimère qui est excisé.

Un défaut d'appariement échappe à la réparation plus souvent qu'il n'est réparé, ce qui provoque la formation d'un asque 3:1:1:3.

Les mutations de transition ne provoquent pas de distorsion importante dans l'hélice et chaque fibre a alors autant de chance d'être réparée. Ceci mène à la formation d'asques 4:4 (deux réparations, chacune dans un sens opposé), 5:3 (une réparation), 3:1:1:3 (pas de réparation ou deux réparations dans des sens opposés) et, moins fréquemment, 6:2 (deux réparations dans le même sens).

c. Puisque la réparation par excision excise le brin opposé à la boucle la plus grande, donc celui qui est en face de la mutation de décalage de la phase de lecture, la mutation de transition qui se trouve en *cis* persistera également. Les gènes voisins seront convertis parce que la réparation par excision se fait sur une certaine longueur de la molécule d'ADN.

9. a. 6:2 = 31,25 %

b. 2:6 = 5 %

c. 3:1:1:3 = 11,25 %

d. 5:3 = 37,5 %

e. 3:5 = 15 %

Chapitre 21

2. Les mutations polaires affectent la transcription ou la traduction d'une partie du gène ou de l'opéron d'un côté seulement du site de la mutation, le côté "aval". Des exemples en sont les mutations non-sens, de glissement de cadre et les insertions du type IS.

4. Les plasmides R sont les principaux porteurs de résistance à des substances telles que les antibiotiques. Ils acquièrent ces gènes par transposition de gènes de résistance localisés entre des séquences répétées inverses. Une fois sur le plasmide, le transposon porteur de la résistance peut être transféré par conjugaison ou bien il peut s'insérer dans le chromosome.

6. Les éléments *P* sont des transposons (gènes flanqués de segments répétés inverses, permettant une grande mobilité). Ils peuvent donc s'insérer dans les chromosomes. En insérant de l'ADN entre les séquences répétées de l'élément P et en injec-

tant les transposons ainsi modifiés dans des cellules, on provoquera le transfert de cet ADN à haute fréquence.

8. La meilleure explication est que la mutation est due à l'insertion d'un élément transposable.

10. a. L'expression de la tumeur est bloquée dans la plante B. Ceci suggère que la plante B puisse inhiber le fonctionnement du plasmide tumorigène ou bien que la plante A fournisse quelque chose au tissu contenant le plasmide que ne peut apporter la plante B.

b. Le tissu porteur du plasmide paraît normal quand il est greffé sur la plante B, mais le greffon produit des cellules cancéreuses en milieu synthétique. Ceci indique que les séquences du plasmide sont présentes et capables de fonctionner dans un environnement correct. Cependant, l'obtention de plantes normales du type A à partir de graines produites par le greffon suggèrent que le plasmide soit perdu au cours de la méiose.

Chapitre 22

3. La transmission maternelle de chloroplastes produit les panachures vertes et blanches observées chez *Mirabilis*.

Croisement 1 : femelle panachée X mâle vert → descendance panachée

Croisement 2 : femelle verte X mâle panaché → descendance verte

5. Les souches de levure parentales apportent toutes deux des mitochondries au cytoplasme de la cellule zygotique diploïde. La méiose donne ensuite un profil d'hérédité uniparentale pour les mitochondries. On obtiendra donc des spores 4:0 et 0:4.

7. Les déterminants génétiques de R et S sont cytoplasmiques et transmis maternellement.

9. Les souches de levure parentales apportent toutes deux des mitochondries au cytoplasme du zygote. La méiose donne ensuite un profil d'hérédité uniparentale pour les mitochondries. Si aucun crossing-over ne se produit dans le diploïde les asques seront de deux types :

$4\ oli^R cap^R$
$4\ oli^S cap^S$

S'il y a crossing-over, les recombinants seront de deux types :

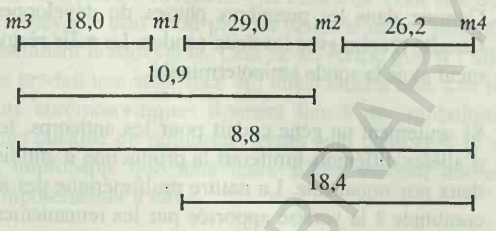
$4\ oli^R cap^S$
$4 oli^S cap^R$

11. Si la mutation est dans le chloroplaste, des croisements réciproques donneront des résultats différents, tandis que si elle est nucléaire et dominante, les croisements réciproques donneront les même résultats.

13. Après la première hybridation, une série de croisements en retour utilisant du pollen de B produira la combinaison désirée cytoplasme A - noyau B. A chaque croisement, la femelle apporte tout le cytoplasme et la moitié du contenu nucléaire, alors que le mâle apporte l'autre moitié du contenu nucléaire.

16. La suggestion est que les mutants étaient des cytohétérozygotes pour la résistance à la streptomycine.

17. Au plus deux gènes sont proches, plus élevé est leur taux de coségrégation. La carte des résultats peut être représentée comme suit :



18. Le phénotype rouge de l'hétérocaryon indique qu'il est causé par un allèle d'organite cytoplasmique.

23. a. et **b.** Chaque méiose montre un profil d'hérédité uniparentale, ce qui suggère une hérédité cytoplasmique.

c. Comme *ant*^{r} est probablement mitochondrial et comme les peptides proviennent de délétions dans le génome mitochondrial, *ant*^{R} peut être perdu chez certaines petites.

25. Considérez la disposition hypothétique suivante pour trois gènes:

a b c

A supposer qu'une délétion de l'un d'entre eux se produise, *b* serait le moins fréquemment à être seul perdu si les gènes étaient fortement liés. Plus *a* est proche de *b*, moins il est probable que *a* soit délété si *b* est retenu.

Appliquons cette logique aux données ; c'est la paire *apt-cob* qui présente le plus faible taux de perte (45 au total), et c'est la paire *apt-bar* qui présente le taux le plus élevé (207 au total). Ceci place *cob* entre *apt* et *bar*. Le taux de perte relative est

apt	*cob*	*bar*
1	2,6	

27. Certaines tétrades seront du type de la souche 1, d'autre du type 2 et certaines seront recombinantes.

28. a. Non ; durant le bourgeonnement de cellules diploïdes les cellules filles ne reçoivent qu'un seul type d'ADNmt.

b. C'est très probablement un plasmide ou un épisome.

30. Etablissez tout d'abord une carte de restriction de l'ADNmt en vous servant de plusieurs enzymes de restriction. A condition que l'évolution ait procédé de manière conservative, un test de Southern formera des hybrides entre fragments équivalents de la levure ou d'un autre organisme chez lequel les gènes ont déjà été identifiés.

31. a. Le cytoplasme de cultures sénescentes est un mélange de mitochondries normales et anormales. Les types mitochondriaux sont répartis suivant des rapports différents d'une spore à l'autre. Les mitochondries anormales semblent avoir un avantage réplicatif sur les normales puisque c'est la sénescence qui finit par l'emporter. La rapidité avec laquelle la sénescence s'installe semble liée au rapport entre mitchondries normales et anormales.

b. La mutation est une insertion d'environ 10kb. Elle apporte les fragments E et G et interrompt le fragment original en deux fragments, B et C.

SUNY AT CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Chapitre 23

1. a. Les embryons femelles réagiront avec les deux anticorps, mais les embryons mâles ne réagiront avec aucun.

b. Comme dans les premières phases du développement, la femelle réagira avec les deux sondes. Le mâle réagira seulement avec la sonde aminoterminale.

2. a. Si seulement un gène codait pour les anticorps, le nombre d'allèles différents limiterait la production d'antibiotiques à deux *par* organisme. La nature multimérique des anticorps, combinée à la variété apportée par les remaniements chromosomiques, permet la production d'un très grand nombre d'anticorps différents. Si l'une ou l'autre manquait la diversité des anticorps serait fortement réduite.

b. Les amplificateurs qui interviennent dans la production d'anticorps sont localisés près de la région constante (C), celle qui sera en effet toujours présente dans l'anticorps après remaniement génétique.

L'amplificateur étant près de la région constante, la transcription ne se produira qu'après qu'un remaniement ait amené un promoteur dans son voisinage. Si l'amplificateur était situé près du segment V, éloigné du segment C, il faudrait qu'une délétion se produise aussi pour amener l'amplificateur près du gène remanié.

5. a. L'exclusion allélique doit précéder l'expansion clonale, ce qui assure une réponse rapide à l'antigène. Si l'exclusion allélique ne se produisait pas, une cellule qui aurait déjà subi un remaniement de sorte qu'elle puisse répondre à un antigène, pourrait encore se remanier par la suite afin de répondre à un deuxième antigène. L'organisme se trouverait donc dépourvu de cellule programmée pour répondre au premier antigène.

b. Approximativement 57.600.000 molécules d'anticorps différentes.

7. a. L'explication la plus probable est que l'intron contienne un codon d'arrêt de traduction.

b. En supposant que la protéine codée par l'ADNc soit capable de fonctionner dans les cellules somatiques, l'ADNc pourrait être raccordé à un amplificateur et introduit dans des oeufs de drosophile.

c. Comme la sonde révèle les huit fragments, chacun contient du matériel exonique et aucun intron ne peut contenir plus d'un site de reconnaissance enzymatique.

9. Normalement le gène *tra* est actif chez la femelle, pas chez le mâle. La forme active du produit du gène *tra* modifie le produit *dsx*, engageant le développement sur la voie femelle. Si le produit *dsx* n'est pas altéré, le développement suit la voie mâle. Une mutation qui produit des organismes femelles par leurs chromosomes mais se développant en organismes phénotypiquement mâles mais stériles, doit mener à la synthèse d'un produit *tra* inactif. Des homozygotes pour la mutation *tra* pourraient recevoir par injection la forme active du produit *tra* tôt au cours de leur développement, ce qui mènerait à la formation de gonades normales mais de sperme inactif.

10. Chez l'Homme, une seule copie du chromosome Y suffit pour orienter le développement vers le phénotype mâle normal. La copie supplémentaire du chromosome X est simplement inactivée. Les deux mécanismes semblent être de tout ou rien plutôt qu'être basés sur des niveaux de concentration.

12. La concentration de *Sxl* est cruciale pour le développement femelle et non pour le développement mâle. Les mutations mâles-létales dominantes Sxl^M peuvent ne pas tuer tous les mâles mais simplement produire une quantité excessive du produit de ce gène, de sorte que seules des femelles (XX fertiles et XY) se développent. Les réversions seraient récessives car, un seul exemplaire du gène pourrait vraisemblablement synthétiser assez de produit pour faire "basculer le commutateur" vers la voie femelle.

Chapitre 24

1. a. Si le nombre de copies d'un facteur de transcription s'accroît, le taux de transcription sera plus élevé. Ceci pourrait accélérer la croissance cellulaire et mener à la formation d'un cancer.

b. Une mutation non-sens ferait décroître la quantité de protéines normales. Si la protéine faisait partie du récepteur d'un facteur de croissance, qui stimule la prolifération cellulaire, la division cellulaire pourrait ne pas se produire.

c. Si la protéine mutante bloque la liaison d'une protéine inhibitrice, la transcription pourrait s'accroître. Un tel accroissement pourrait conduire à une croissance non régulée, c'est-à-dire au cancer.

d. La protéine kinase cytoplasmique spécifique de la tyrosine phosphoryle les protéines en réponse à des signaux reçus par la cellule. Les phosphorylations mènent à l'activation de facteurs de transcription nécessaires au stade suivant du cycle cellulaire. Si le site actif est altéré, les phosphorylations ne se produiront pas et les facteurs de transcription ne seront pas activés.

3. a. Il doit exister une substance diffusible produite par la celllule d'ancrage et qui affecte le développement des six PVC ; 1° montre la réponse la plus forte à cette substance et 3° représente une absence de réponse suite à l'absence où à une concentration trop faible de la substance.

b. Retirez la cellule d'ancrage et les six cellules Pn.p. Disposez les cellules Pn.p en cercle autour de la cellule d'ancrage. Toutes les six développeront le même phénotype, qui dépendra de leur distance par rapport à la cellule d'ancrage.

6. Comme le récepteur est défectif, la testostérone ne peut pénétrer dans la cellule et déclencher la cascade qui ferait basculer l'embryon de la voie femelle "par défaut" vers la voie mâle. Le phénotype sera donc femelle.

8. a. Le type B est probablement le résultat d'un défaut de la cellule cible.

b. Le diabète de type B semble être due à un défaut de la cellule cible. Un certain nombre de gènes interviennent dans la formation du récepteur et dans la cascade de changements qui, en aval, aboutit à une modification de la transcription. N'importe lequel de ces gènes pourrait avoir muté.

Chapitre 25

1. Le développement humain, comme celui de tous les organismes multicellulaires, est un processus qui se poursuit tout au long de

la vie et ne s'arrête qu'à la mort. Il est le résultat d'interactions complexes entre le donné génétique et l'environnement, du "bruit de fond" (voyez le chapitre 1) et du hasard. Il n'y a pas de "phénotype final" per se.

5. L'expression correcte de *ftz* requiert *Kr* dans les quatrième et cinquième segments et *kni* dans les cinquième et sixième.

8. L'axe antéro-postérieur serait inversé.

Chapitre 26.

1. Sélection, mutation, migration,consanguinité et dérive génétique aléatoire.

2. A1 = 0,57, A2 = 0,43

4. 0,65

6. **a.** p= 0,5249, q=0,4751
Si la population est en équilibre, les phénotypes devraient se distribuer comme suit :

$L^ML^M = 408$
$L^ML^N = 739$
$L^NL^N = 334$

La population est en équilibre.

b. Si les couples se forment au hasard en ce qui concerne les groupes sanguins, les fréquences suivantes devraient se présenter :

$L^ML^M \times L^ML^M = (p^2)(p^2)(741) = 56,25$
$L^ML^M \times L^ML^N = (2p^2)(2pq)(741) = 203,6$
$L^ML^M \times L^NL^N = (2p^2)(q^2)(741) = 92$
$L^ML^N \times L^ML^N = (2pq)(2pq)(741) = 184,28$
$L^ML^N \times L^NL^N = (2)(2pq)(q^2)(741) = 166,8$
$L^NL^N \times L^NL^N = (q^2)(q^2)(741) = 37,75$

Les couples se forment effectivement au hasard par rapport au type sanguin.

8. **a** et **b.**

population	p	q	équilibre
1	1,0	0,0	oui
2	0,5	0,5	non
3	0,0	1,0	oui
4	0,625	0,375	non
5	0,3775	0,625	non
6	0,5	0,5	oui
7	0,5	0,5	non
8	0,2	0,8	oui
9	0,8	0,2	oui
10	0,993	0,007	oui

c. 0,102
d. p = 0,56, q = 0,44

10. La fréquence d'un phénotype dans la population est fonction de la fréquence des allèles qui déterminent ce phénotype dans la population. La dominance et la récessivité peuvent être déterminées par des croisements de type mendélien.

12. La dominance caractérise généralement le type sauvage puisque la plupart des mutations détectables touchant les enzymes diminuent ou éliminent la fonction de l'enzyme. Pour être dominant, l'hétérozygote doit avoir plus ou moins le même phénotype que le dominant homozygote. Ceci ne se vérifie que si l'allèle sauvage produit une substance et l'allèle mutant non. Les remaniements chromosomiques donnent lieu à des mutations dominantes puisque de nombreux gènes sont concernés et qu'il est très improbable que tous leurs allèles seraient dominants et «s'imposeraient» à eux.

15. Le type albinos a pu être considéré comme portant bonheur et encouragé à se reproduire à des niveaux élevés en comparaison avec les non-albinos. Ils ont pu être aussi enclins à s'unir entre eux. Au contraire, chez les tribus à fréquence très faible d'albinos, les albinos ont pu être rejetés et éliminés à la naissance ou écartés du mariage.

18. **a.** 0,528
b. 0,75

19. 0,01

21. 6,5

Chapitre 27.

2. **a.** longueur du jarret
$H^2 = 0,200$ $h^2 = 0,150$

longueur du collier
$H^2 = 0,600$ $h^2 = 0,010$

teneur en graisses
$H^2 = 0,500$ $h^2 = 0,400$

b. La teneur en graisses devrait le mieux répondre à la sélection
c. 8.9 %

3. **a.** p (homozygote à 1 locus) = $3(1/2)^3 = 3/8$
à 2 loci) = $3(1/2)^3 = 3/8$
à 3 loci = $3(1/2)^3 = 1/8$

b. p (0 lettres capitales) = 1/64
p (1 lettre capitale) = 3/32
p (2 lettres capitales) = 15/64
p (3 lettres capitales) = 10/32
p (4 lettres capitales) = 15/64
p (5 lettres capitales) = 3/32
p (6 lettres capitales) = 1/64

5. La population décrite se distribuerait comme suit :

3 soies 19/64
2 soies 44/64
1 soie 1/64

Notez que la classe 3-soies contient 7 génotypes différents, la classe 2-soies 11 génotypes et la classe 1-soie ne comporte

B.C.U. „N. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

qu'un seul génotype. Il serait très ardu de déterminer la base génétique de cette situation en réalisant des croisements contrôlés et en déterminant des fréquences dans les descendances.

7. Moyenne = 4,7

Variance = 0,2619

Ecart-type = 0,5117

9. a. H^2 n'a de signification que par rapport à la population étudiée dans le milieu au sein duquel sa valeur a été déterminée. Sinon, elle n'a pas de sens.

b. Ni H^2 ni h^2 ne sont des valeurs qui peuvent être utilisées pour généraliser d'un échantillon particulier à l'ensemble de la population humaine. Elles ne devraient certainement pas être utilisées dans une prise de décision de nature sociale (comme implicite dans les termes eugénique et dysgénique).

c. Ni H^2 ni h^2 ne sont des mesures fiables et elles ne devraient pas être utilisées dans quelque prise de décision concernant des problèmes sociaux.

11. Tout d'abord, définissez l'alcoolisme en tant que comportement. Ensuite, rendez-vous compte que toutes les observations doivent être limitées au comportement utilisé dans la définition et que toutes les conclusions de vos observations ne s'appliquent qu'à ce comportement. Pour pouvoir rassembler vos données, vous devez travailler avec une population dans laquelle les liens de parenté se distinguent de l'héritabilité. Pratiquement, cela implique de faire usage d'individus génétiquement proches mais qui se trouvent dans tous les types de milieu.

14. a. Si nous admettons que les individus à l'extrémité de l'échelle des tailles sont homozygotes, leur descendance sera plus vraisemblement hétérozygote que les individus d'origine, c-à-d qu'ils seront moins situés aux extrêmes.

b. Dans le cas des données de Galton, la régression est une estimation de l'héritabilité (h^2), en tenant pour acquis qu'il y a peu de différences de milieu entre père et fils.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Index

A, gène, 98
α-Amylase, chez *Drosophila pseudoobscura*, 785
A/P (antéro-postérieur), axe, 748-750, 755-758, 765
A/P, information positionnelle, gènes, 755-758
Abeille, chromosomes, 495
ABO, groupes sanguins, 93-94
Abraxas (Phalène du groseiller), couleur de l'aile, 64-65
Achillea millefolium, norme de réaction, 15, 16, 17
Achondroplasie
  étude du profil de transmission, 34, 35
  fréquence de mutation, 192
Acide aspartique, 346
Acide désoxyribonucléique (ADN), 2, 7-8, 314-315
  attachement à l'armature, régions (scaffold attachment regions), 498, 500
  banque, 434-435, 436
  brin non transcrit, 386
  brin transcrit, 321, 386
  cadre(s) de lecture, 447, 448
  cartes de gènes, 334-336
  centromérique, 502-503, 509
  chimérique ou recombinant, 424
  circularisation, 334
  classification, 505
  clonage, 424, 531-534. *Voir aussi* Gène(s), clonage
  complémentarité de l'ARN, 386
  diamètre, 319
  double hélice, 316-319
    aspect tri-dimensionnel, 319-320
  égoïste, 512-513
  emmagasinage dans les chromosomes, 497
  espaceur, 511-513
  étranger, 426, 428
  extrémités cohésives (bouts collants), 426, 429
  forme A, 319-320, 321, 322
  forme B, 320, 321, 322
  forme Z, 320-321, 322
  forme fermée des séquences promoteur, 388
  fractionnement électrophorétique, 442-444
  fragments d'Okazaki, 330
  Hershey et Chase, expérience, 314-315
  hétéroduplex, 619, 620
  lésions par oxydation, 590
  lésions, induction de p21 par p53, 728-729
  liaisons hydrogène, 318-319
  liens phosphodiester, 316, 318
  marqueur, 449-451, 525-528
  minisatellite, 509-511
  mitochondrial, mutations, 680,681
  non codant, 508-509
  réassociation des brins (reannealing), 505
  recombinant, 424-451. *Voir aussi* ADN recombinant
  régions promoteur, 387
  régulation spécifique d'un tissu, 694-695
  réparation des lésions, 601, 603-607
  répétitions en tandem en nombre variable (VNTR), 509-511, 512
  réplication, 8, 9, 320, 321-334, 384
    autoradiographie, 323-324, 325
    bidirectionnelle, 328, 329
    brin synthétisé de façon discontinue, 329-330, 331
    brin synthétisé de façon continue, 329-330, 331
    chez les eucaryotes, 332-334
    conservative, 323
    dispersive, 323
    exonucléase «correctrice d'épreuves», 331-332, 333
    fourche, 326, 327, 331
    hélicase(s), 327, 330-331, 332
    mécanisme, 326-332
    Meselson et Stahl, expérience, 323, 324
    origine(s), 328, 329, 333-334
    semi-conservative, 321-324, 325
    surenroulement, 331, 332
    terminus, 328
    topoisomérases, 327, 330-331, 332
  satellite, 509
  sauvetage de marqueurs, expérience (marker-rescue), 334-336
  séquençage par la méthode des terminateurs didésoxy, 446-447
  séquençage par réaction chimique des bases, 444-446
  séquences transposées, 511
  sillons, 320, 322
  sites de clonage multiples, 431
  sonde(s), 437
  structure, 315-321
    en double hélice, 316-319
  transcription, 384-389, 564-566
    activateurs à spécificité tissulaire, 695-696
    contrôle agissant en cis, 566-568
    contrôle agissant en trans, 566-568
    régulation, 695-697
    régulation spécifique d'un tissu, 695, 696-697
    rôle de la 5-méthylcytosine, 575
    stade d'élongation, 388, 389, 390
    stade d'initiation, 387-388
    stade de terminaison, 388-389, 390
    symétrie, 386
  transformation, 314-315
  variations neutres, utilisation en cartographie chromosomique, 525-528
Acide nitreux, mutagénèse à l', 59
Acide ribonucléique (ARN), 385
  autoépissage, 412, 414
  chez les eucaryotes, 408-412
  complémentarité avec l'ADN, 386
  de transfert (ARNt), 9, 384, 391, 396
    espèces d', 398
    initiateur, 401
    isoaccepteur, 398
    reconnaissance des codons par, 396
    structure, 397
    synthèse artificielle de, 462-463, 464
  épingle à cheveux de, 388, 390
  messager (ARNm), 9, 384, 391
    chez les eucaryotes, 409-411
    dégradation, 575, 578
    épissage, 411-416
    épissage différentiel, 575, 576, 577
    localisation polaire, 758, 759

BOU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

polycistronique, 546, 548
régulation, 697-698
propriétés, 385
ribosomique (ARNr), 9, 384, 391
de *Tetrahymena*, 414
synthèse, 385-386, 409
Voir aussi à. Acide désoxyribonucléique (ADN), transcription de
traduction, 384, 389-391, 416-417, 418. *Voir aussi à* Synthèse des protéines
transposition via, 655-656
Acides aminés, 354, 356
codons, 392-399
séquençage, 347, 349, 352, 353
Acridine orange, comme agent mutagène, 597
Actine, 721, 722
polarité des sous-unités, 723
Actinorhodine, production par des bactéries, 467
Adaptateur (polylinker), 431
Adaptateur(s), protéine(s), 733
Adénine méthylase, 607
Adénine, 316, 317
Adénovirus, en thérapie génique, 481-482
ADN glycosylase
chez *E. coli*, 611
voie de réparation, 605-606
3-mA-ADN glycosylase, 606
5-mC-ADN glycosylase, 606
5,6-HT-ADN glycosylase, 606
ADN gyrase, 331, 332
ADN ligase, 330
ADN polymérase I (pol I), 326-327
ADN polymérase II (pol II), 327
ADN polymérase III (pol III), 327, 330, 331
ADN polymorphes amplifiés au hasard (RAPD) en cartographie chromosomique, 529
ADN recombinant, 424-451, 465-478
amplification, 428, 430
réaction de polymérisation en chaîne, 448-449
applications, 460-486
chez les animaux, 475-478
chez *E. coli*, 463-464
chez les eucaryotes, 465-478
chez les plantes, 473-475
chez la levure, 467-472
diagnostic des maladies génétiques, 482-486
génétique inverse, 464-465
mutagénèse in vitro, 460-462
organismes transgéniques, 466-467, 476-479
synthèse de gènes, 462-463
thérapie génique, 478, 480-482
banques d'ADN, 434-435, 436
chromosomes artificiels de levures, 434
chromosomes bactériens artificiels, 434
cosmides, 433
criblage génétique à l'aide de, 482-486
donneurs pour, 424
electrophorèse de, 442-444
enzymes de restriction pour, 425-426, 427
formation d'extrémités cohésives pour, 426, 429
fractionnement de 442-444, phages pour, 432-433, 436
isolement de l'ADN et, 424
jonction de l'ADN et, 426, 428
phages à simples brins pour, 434
sondes pour, 435, 436-439
vecteurs d'expression pour, 434, 439
vecteurs plasmidiques pour, 430-432
vecteurs pour, 424, 430-434
Aegilops umbellulata, 266-267
Aflatoxine B1, comme agent mutagène, 599-600, 601
Agents alkylants, en mutagénèse, 596, 610
Agrafe à leucines, 570, 571
Agriculture, 3-4
amélioration par mutation, 203
génétique mendélienne, 37, 40, 41, 42
translocations chromosomiques, 230
Agrobacterium tumefaciens, 473
Ajouts volumineux, 599
Alanine, 346
Albinisme, 34, 99
Albinisme, chez les oiseaux, 99
Albumine, évolution, 631, 632
Alkyltransférases, 603
chez *E. coli*, 611
Allèle de type non-sauvage, 67
Allèle(s)
autonome(s), 658
couplés, 124, 126
d'incompatibilité,94-95, 96
dominant(s), 27
en situation de répulsion, 125, 126
épistatique(s), 100-101
létal (-aux), 95-98
multiples, 93-95
non-sauvages, 67
paramutable(s), 698
paramutagène(s), 698
parental (-aux), 125
rareté, 33
récessif(s), 27
recombinants, 125
sauvage(s), 67, 182
symboles, 67-68
thermosensibles, 355-356
Allèle-non autonome, 658
Allélisme
multiple, 93-95
test opérationnel, 94, 105
Allélisme multiple, 93-95
Allopolyploïdes, 251-252
par hybridation somatique, 257
synthèse, 254-257
Allostérie, 552
Alternance de générations, 78, 80-82
Alzheimer, maladie, gène responsable, 4
Ambre, codon, 399
2-Aminopurine, agent mutagène, 593, 595
Amniocentèse, 482
Amorce (primer), 327, 329
Amphibiens, polyploïdes, 257
Amphidiploïdes, 254-255
Amplificateur (enhancer) de SV40, 568
Analyse de la recombinaison, 131-134
Analyse généalogique, 32-37
de l'achondroplasie, 34,35
de l'hémophilie, 72, 73
de l'hypophosphatémie, 73
de la brachydactylie, 36
de la maladie de Huntington, 35
de la phénylcétonurie, 33, 34
de la polydactylie,36
des «dégustateurs» de PTC, 39
des affections dominantes, 34-37
des phénotypes dominants liés à l'X, 73
des phénotypes récessifs liés à l'X, 71-73
du dimorphisme, 37
du phénotype bigarré, 38, 39
du polymorphysme, 37
symboles de, 32
Analyse génétique, 17-19. *Voir aussi* Dissection génétique
Anaphase
méiotique, 59-62, 77
mitotique, 57, 58
Ancrage, cellule, 734-736
Anémie
à cellules falciformes, 12, 92-93, 350-352
de Fanconi, 612, 613
Aneuploïde, 253
Aneuploïdie, 258-266
disomique, 258, 263-264
et leucémie myéloïde chronique, 266
monosomique, 258, 259-260
non-disjonction, 259, 260
nullisomique, 258, 259
somatique, 264-266
trisomique, 258, 261-263
Anomalies héréditaires du métabolisme, 800
criblage, 483
Anti-sens, oligonucléotides, pour l'inhibition de la synthèse de protéines, 406, 407
Antibiotiques, production par des bactéries, 467
Anticorps
comme sonde(s) pour déceler des protéines, 437-439
diversité, 713-715
structure, 713
voies de synthèse, 712-715
AP (apuriques, apyrimidiques), sites,605-606
AP, endonucléases, 607
AP, voie de réparation utilsant les endonucléases, 606-607
Appariement par assortiment, 794-797
Ara, opéron, 555, 557-558
Arginine, 346
ARN polymérase, 384, 387
facteur rho, sous-unité de, 389, 390
facteur sigma, sous-unité de, 388
structure de, 387, 409
ARN polymérase I, 409
ARN polymérase II, 409, 1053
ARN polymérase III, 409
Aruncus dioicus, 70
Ascospore, 79
Asparagine, 346
Aspartate transcarbamylase, structure, 349
Aspergillus nidulans, cartographie chromosomique, 169-171
Aspergillus, recombinaison mitotique, 169-171
Asque, 160
Assortiment indépendant, 29-30
Ataxie - télangiectasie, 612, 613
Atténuateur, 560
Auto-incompatibilité, 94-95, 96
Autofécondation, production d'homozygotes par, 39
Automeris io io, gynandromorphe de, 265
Autonome, allèle, 658
Autophosphorylation, 732
Autopolyploïdes, 251-252
Autoradiographie de la réplication de l'ADN, 323-324, 325
Autosomes, 71
Autotétraploïdes, 253-254
Auxotrophe(s), 343

de *Neurospora*, 343-345
Auxotrophie, 186
réversion vers la prototrophie, 192-193
Axes corporels, 748-750

B, gène, 99
Bactéries, 276
auxotrophes, 276
cartographie du chromosome, 302, 303
circularité du chromosome, 281-283
clones, 276
compétentes, 291
croissance, 276
expériences de croisement interrompu, 280, 281
expression de gènes eucaryotiques, 463-464, 630, 631
expression génique, 417, 418
facteur de fertilité, 277-279
découverte, 280-281
et circularité du chromosome, 281-283
états, 283
transfert, 281
lysogènes, 295-296, 299-300
mutants résistants, 276
prototrophes, 276
recombinaison génétique, 276
associée à la conjugaison, 277-290
Voir aussi Conjugaison bactérienne
associée à la transduction, 298-301
associée à la transformation, 276, 290-291, 304
représentation symbolique des génotypes, 277
souches Hfr(haute fréquence de recombinaison), 279, 281, 282, 286
transfert de gènes, 302-304
directionnalité, 280
découverte, 279
gradient de fréquence, 286-287
par conjugaison, 277-286
transformation, 324-325
variants stériles, 280-281
Bactériophage(s). *Voir* Phage(s)
Balayage du génome à l'aide de repères de restriction, 529
Balbiani, anneaux de, sur les chromosomes, 215
Bam HI, 427
Bandes chromosomiques, 214-216, 501-502
Banque d'ADN, 434-435, 436
complémentaire (ADNc), 435
génomique, 435, 436
Barr, corpuscule, 74
Base(s), 586
analogues, 593-595
courtes répétitions directes, 591, 592
décalage, 587-588
délétions, 589-590
dépurination, 589-590
désamination, 590
duplications, 589-590
endommagées par oxydation, 590
forme cétone, 586
forme énol, 586
mal appariées, 586, 596-597
perte d'un paire, 597-600
substitutions par mutagénèse in vitro, 460-461
transitions, 586
transversions, 586
BCD, gradient, 756-758
bcd, gène, 755-758
Beagles, taches pie, 109
Belles-de-nuit, 92
Benzo(a)pyrène, 599, 602
Bgl II, 427
Bigarré, phénotype
analyse généalogique, 38, 39
gène S dans, 101, 102, 109
Biologie et génétique, 7-11
Biosynthèse, voies, 342-343
Biotechnologie, 4, 466-467
Biotine, rôle dans la croissance de *Drosophila*, 17
Biparental, zygote, 671
Blastoderme
cellulaire de *Drosophila*, 752, 753
syncitial de *Drosophila*,753
Blastoderme cellulaire de *Drosophila*, 752, 753
Blé
évolution du, 255, 256
nullisomique, 259
résistance à la rouille foliaire, 266-267
Bloom, syndrome de, 612-613
Boîte CCAAT, 567-568
Boîte TATA , 567-568
Boucle d'inversion, 225
Brachydactylisme, analyse du pedigree, 36
Branchement entre chromatides, à la recombinaison, 619
Branchement, migration à la recombinaison, 619-620
Brassage d'exons, 413,415
Brassica, 255, 256
BRCA1, gène, 4-5
BRCA2, gène, 4-5
Brebis transgénique, 476
5-Bromouracile, agent mutagène, 593, 594, 595
Burkitt, lymphome, 233

C, gène
chez les lapins, 94
chez les mammifères, 99-101
c-Fos, 578
c-Myc, 578
χ^2, test, 137-138, 140
Cadre de lecture ouvert, dans le séquençage de l'ADN, 447, 448
Caenorhabditis elegans
cytokinèse, 724-725
formation de la vulve, 734-735
Caille japonaise, mutation chez la, 184, 185
Calcitonine, 577
peptide correspondant au gène (CGRP), 577
Calico, chat, 74, 75
Cancer de la peau, gène *p53* et, 601
Cancer du cerveau, 737
Cancer du sein familial, gène, 4-5
Cancer, 736-743
cellules cancéreuses vs cellules normales, 736
délétions chromosomiques, 220, 221
effet des mutations induites, 600-601
gènes suppresseurs de tumeurs, 742-743
mutations, 199-201, 600-601, 738-743
oncogènes, 738, 739-742
théorie des perturbations multiples, 737
translocations chromosomiques, 231-232
Candidats, gènes, 536
Capsella bursa-pastoris, gènes dupliqués de, 106, 107
Capture de gènes, par piégeage des activateurs, 701-703
Caractère génétique, 23
forme (phénotype), 24
variant, 24
Caractères canalisés, 789
Carboxypeptidase, site actif, 352-354
Cardinaux, gènes, 761-762
Carré de Punnett, 29, 30
Carte génétique. *Voir aussi* Cartographie chromosomique
en relation avec l'évolution, 235
en relation avec la structure de l'ADN, 334-336
Cartographie chromosomique, 129-131, 524-530
analyse par amplification aléatoire d'ADN polymorphe, 529
analyse par délétions, 218, 532-533
chez *Aspergillus nidulans*, 169-171
chez *Cochliomyia hominivorax*, 131, 132
chez *Drosophila*, 131-134, 136
chez *E. coli*, 301, 302, 303
chez *Neurospora*, 526
chez l'Homme, 142-143, 219-220, 221, 533-536
chez la levure, 166-167
chez la tomate, 138-139
chez les champignons, 161-166, 169-171
chez les espèces haploïdes, 160-167
comparaisons intergénériques, 234, 235
croisement-test impliquant trois gènes liés, 131-134
de cellules hybrides rongeur-homme, 522-524, 525, 529-530
de la mucoviscidose, 533-536
distribution de Poisson, 157, 158
électrophorèse en champs alternés, 522, 523
expériences de croisement interrompu, 281, 282
fonction cartographique, 156-159
fréquence de recombinaison, 135, 136, 156-159
hybridation in situ révélée par fluorescence, 521-522
hybridation in situ, 219, 521-522
interférence, 134-135
liaison génétique, 124-126, 520-521
marqueurs d'ADN, 525-528
marqueurs microsatellites, 527-528
marqueurs minisatellites, 527-528
optique, 531
par délétions, 218-220, 221
par fusion de cellules irradiées, 530
par recombinaison méiotique, 126-127
par transfert de gènes, 529-530
physique, 533-536
points de rupture des remaniements chromosomiques, 522
polymorphisme de longueur de séquences simples (SSLP), 526-527
polymorphisme de longueur des fragments de restriction, 526
symboles, 127-128
test de χ^2, 137-138, 140
tri de chromosomes par fluorescence, 532, 533

DEASI CENTRAL UNIVERSITY LIB

variations neutres de l'ADN, 525-528
Cartographie du centromère, 162-163
Cartographie par restriction, 449-451
comparée à la cartographie par les RFLP, 486
Cascade de transduction de signal, 732-733
Catalase, 602
Cellule initiale embryonique, 772
Cellule nourricière chez *Drosophila*, 751
Cellule(s). *Voir aussi* Cytosquelette
cancéreuse(s), 736
communication intercellulaire, 729-736
d'ancrage, 734-736
détermination de la destinée, 748
diploïde(s), 59, 76
complémentation, 370
cycle vital, 78
méiose, 58-62, 63
mitose, 56-58, 63, 78
fille(s), 8
forme, 721
haploïde(s), 59-78
croisement génétique, 79, 81
cycle vital, 78-80
inhibition latérale, 734-735
systèmes de signalisation, 729-736. *Voir aussi* Systèmes de signalisation intercellulaire
transgénique(s), 4
transport dans, 721-723
Cellules de pollen, délétions chromosomiques, 220
Centimorgan (cM), 129
Centre organisateur des microtubules, 723
Centromère, 58
Cepaea nemoralis, coloration de la coquille, 782-783
Champ de développement, 749
Champignon(s)
cartographie chromosomique, 161-166, 169-171
croisement(s), 79, 81
cycles vitaux, 78, 79, 80
hérédité extranucléaire, 666-668
mitose, 79
recombinaison mitotique, 169-171
secteurs blancs haploïdes, 170
secteurs jaunes diploïdes, 170-171
Chats «écaille de tortue», 74
Cheval, couleur de la robe, 102
Chi, site, 626-627
Chiasma (chiasmata), 59, 125, 618-619
Chlamydomonas
fréquence de mutation, 192
gènes extranucléaires, 668-671
génome du chloroplaste, 671, 678-680
Chloroplaste, gènes, chez *Chlamydomonas*, 671, 678-680
Chromatide(s), 8, 57, 58, 59
conversion, 622-624
interférence lors du crossing-over, 141
structure, 326
Chromatine, 497
condensation, effet de la concentration saline, 496
réplication, 513, 514
transcription, 513, 514
Chromatographie à deux dimensions, 349, 350
Chromocentre, 214, 215
Chromomères, profil de distribution, 213-214
Chromosome 1
carte de liaison, 142, 143
évolution, 235
Chromosome 2, évolution, 235
Chromosome 3
de *Saccharomyces cerevisiae*, 536, 538
évolution, 235
inversion, 227, 228
Chromosome 5, syndrome du cri du chat, 219
Chromosome 11, 220, 221
Chromosome 21, syndrome de Down, 230-231, 232
Chromosome de Philadelphie, 740, 741
Chromosome(s), 2, 5
à la méiose, 58-62, 63
à la mitose, 56-58, 63
acentrique(s), 213
acrocentrique(s), 212, 213
anneaux de Balbiani, 215
arlequin, mise en évidence, 324, 325
armature (scaffold), 498, 499
assortiment indépendant, 64
bandes, 214-216, 501-502
bivalent(s), 253
chromocentre(s), 214, 215
chromomère(s), 58, 213-214
circularité et intégration du facteur de fertilité, 281-283
crossing-over, 125
de *Datura stramonium*, 64, 65
de *Drosophila melanogaster*, 495-496
de Hfr, 280, 281-283
délétion(s), 216, 217-220
chez le maïs, 216
et cancer, 220, 221
interstitielle(s), 217
intragénique(s), 217
létale(s), 217
multigénique(s), 217
production expérimentale, 233
provoquée(s) par des éléments transposables, 646, 648, 650
terminale(s), 217
disomiques, 263-264
duplication(s), 217, 220-224
en sens inverse, 221, 222
en tandem, 221, 222
production expérimentale, 226, 227, 233
enroulement, 497-500
et maladies génétiques, 5, 6
euchromatine, 214, 500-501
fils, 8
hétérochromatine, 214, 215, 500-501
homéologues, 252
homologues, 58, 125
inversion(s), 217, 224-228
boucle correspondante, 225
chez l'être humain, 227, 228
fragment acentrique, 225
paracentrique(s), 225
péricentrique(s), 225, 226
pont dicentrique, 225
jeu allopolyploïde, 258-266
jeu aneuploïde, 258-266
jeu monoploïde, 250-251
jeux euploïdes, 250-257
longueur de l'ADN, 494-497
chez l'être humain, 230-232
dystrophie musculaire de Duchenne, 231, 232
et cancers, 231, 232
lymphome de Burkitt, 233, 234
neurofibromatose, 232
panachure liée à la position, 233
production de délétions, 233
syndrome de Down, 230-231, 232
production de duplications, 233
métacentrique(s), 212, 213
monosomique, 259-260
nullisomique, 259
organisation génétique, 504-513
origine de transfert chez les bactéries, 281, 282
paire hétéromorphe, 63-64, 66
paires, 64
perte à la mitose, 168
polyploïdie, 251-252, 257-258
polytène(s), 214-216, 502, 503, 504
position du centromère, 212, 213
puff(s) ou nodule(s), 215
quadrivalent, 253
recombinaison, 126-127, 618-632. *Voir aussi* Recombinaison
saut sur le, 535, 536
ségrégation de type adjacent-1, 229
ségrégation de type adjacent-2, 229
ségrégation de type alterné, 229
ségrégation, 64, 229
structure, 324, 326
taille, 212, 213, 494-497
télocentrique(s), 212, 213
tétraploïdie, 253-254
topographie, 212, 213-216
translocation(s), 217, 228-234
triploïdie, 252-253
trisomique, 261-263
trivalent, 253
univalent, 253
Chromosomes bactériens artificiels pour le clonage de gènes, 434
Chromosomes sexuels, 70-76
allèle suppresseur, 106
chromosome X, 68, 69, 70, 507
chromosome Y, 64-67, 70
chromosomes sexuels, 64-67, 68, 69, 70
croisement-test à trois facteurs, 131-134
détermination du sexe, séquence de régulations, 705-709
mutations, 709
éléments transposables, 650-653
gènes actifs dans le zygote, 761-763
panachure, 168
Sxl, gène, 708-709
Tab, gène, 704
taches jumelées, 168-169
transgénique, 476
variants de l'aile, 18, 185
Cis-trans, test, 373
Cistron, 373
ClB, chromosome de *Drosophila melanogaster*, 197-198
test, 197-198
Clone(s), 182, 276. *Voir aussi* Gène(s), clones de
Co-conversion, à la recombinaison, 625
Cochliomyia hominivorax, cartes de liaison, 131, 132
Code génétique, 320, 392-399
à triplets, 392-394
chevauchant, 392-393
déchiffrement, 395-396
dégénérescence, 394-395
dictionnaire, 397
non-chevauchant, 392-393
universalité, 406-408

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA

Codominance, 92, 93
Codons non-sens, 399
Codons stop, 398-399
Codons, 392-399
  reconnaissance par les ARNt, 396, 397, 398
Coefficient de coïncidence, 134
Coefficient de consanguinité, 795
Coefficient de corrélation, 824
Coïntégrat, stade de la transposition des éléments génétiques, 645
Colchicine, dans la production de plantes diploïdes, 250-251
Colinéarité des mutations géniques et protéiques, 352, 353
Colon, cancer, 737
Colonie bactérienne, 276
Colorectal, cancer non-polypeux héréditaire, 612, 613
Commutateur de développement, 704-705, 708, 731-732
Commutation de tautomères, 586
  comparée à une mutation, 587
Complémentation fonctionnelle, 439, 440, 441
Complémentation, 369-373
  chez des diploïdes, 370
  chez des haploïdes, 371
  et détermination du phénotype, 103, 169
  vs. recombinaison, 371-372
Complexe promoteur ouvert, 388
Conidie, 79, 169
Conjugaison bactérienne, 276, 277-286, 304
  cellules donneuses, 280-281
  cellules réceptrices, 280
  chez *E. coli*, 284-286
  crossing-over associés, 288, 289
  découverte, 279
  détermination de l'ordre des gènes, 287-289
  facteur de fertilité, 277-279, 280-281
  mesure de la liaison, 287
  nécessité d'un contact physique entre cellules, 279-280
  polarité du transfert, 280
  souches Hfr, 281
Conjugaison, 276
  chez les bactéries, 277-286
    rôle du facteur de fertilité, 277-279
Consanguinisation, 33-34, 794-797, 828
Constitutif, mutant, 549
Conversion chromatidique, 622-624
Conversion de demi-chromatide, 622-624
Conversion génique, 623
Conversion, associée au crossing-over, 624-625
Copia, éléments génétiques transposables chez *Drosophila*, 650
Copolymères répétitifs de nucléotides, 396-397
Corrélation génétique, 823-825
Cosmides, vecteurs de clonage, 433
Cotransductants, 300
Couleur du pelage
  allèles mutants, 188, 189
  gènes responsables, 98-102
Couleuvre (*Elaphe guttata*), couleur de la peau, 102-103, 104
Court élément répété (SINE), 511
Covariance, 824
  en génétique quantitative, 823-825
CpG, îlots, 535
Creuzfeldt-Jakob, maladie, 358
Cri du chat, syndrome du, 219
Croisement interrompu, technique de, 280, 281, 282
Croisement monohybride, 28
Croisement-test, 30
  à trois facteurs, 131-134
  dans l'analyse de liaison, 124-125
Croisements génétiques
  carré de Punnett, représentation, 29-30
  diagrammes dichotomiques, 28, 29, 30-31
  dihybrides, 28
  entre haploïdes, 79, 81
  modèle de Holliday, 620-625
  monohybrides, 29-30
  réciproques, 24-26, 27
  souche test (testeur), 29-30
Crossing-over, 125, 140-142, 618
  analyse de tétrades, 141
  coefficient de coïncidence, 134
  conversion génique, 624-625
  double, 133, 134, 141
  interférence chromatidique, 141
  interférence, 134-135
  mitotique, 168-171
CsCl (chlorure de césium), gradient, 323
  vs.gradient de sucrose, 390
Culture de cellules pour la sélection de mutations, 196-197
Cycle cellulaire, 56, 57, 78, 332, 725-729
  chez l'embryon de *Drosophila*, 753
  chez la levure, 726-727
  cyclines, 727
  points de contrôle, 729
  protéine kinases cycline-dépendantes, 727-729
Cycline(s), 727
Cycline-dépendantes, protéine kinases, 727-729
  cibles, 727-728
  contrôles négatifs d'activité, 728-729
Cystéine, 346
Cytogénétique, 250-251
Cytohet, 671
Cytokinèse, 724-725
Cytomètre de flux, utilisation pour construire les banques d'ADN, 435
Cytoplasme, 664. *Voir aussi* Génome extranucléaire
Cytosine, 316, 317
Cytosquelette, 720-725
  contrôle du fuseau mitotique, 723
  dans le transport intracellulaire, 721-723
  et division cellulaire, 723, 724-725
  forme de la cellule, 721
Cytotype M, dans la dysgénèse hybride, 651

D, gène, 101
D/V, gènes de mise en place, 755, 758-760
Daltonisme rouge-vert, 71
Darwin, Charles, théorie de l'évolution, 780
Datura stramonium (herbe de Jimson), chromosomes, 64, 65
Décalage du cadre de lecture (frameshift), mutations, 394, 587-588, 600
Decapentaplegic (Dpp), gène, 762, 763
Degrés de liberté, 137, 138
Dégustateurs de PTC, analyse généalogique, 39
Délétion(s)
  boucle correspondante, 217, 218
  cartographie par, 218, 364, 366
  chromosomique(s), 216, 217-220. *Voir aussi* Chromosome, délétions
  mutation(s), 588-589
Dépurination, mutations, 589-590
Dérive génétique («Genetic drift»), 807-808, 810
Dérive génétique aléatoire, 807, 810
Désamination, mutation, 590
Descendance exceptionnelle de première génération, 68, 69
Descendance exceptionnelle de seconde génération, 68,69
Déséquilibre génomique, 253
Desmine, 722
Désoxyribose, sucre, 317
Destinée cellulaire, 748
Détermination cellulaire, 748
Détermination du sexe
  chez Drosophila, 705-709
  chez les mammifères, 709-712
  chromosome Y et, 710-712
  non-autonome, 710
Détermination par l'environnement, 13
Deuxième loi de Mendel, 29, 76
Déviation standard, 822-823
Diagramme dichotomique
  dans les croisements génétiques, 29. 30-31
  des rapports génotypiques, 30-32
Diakinèse méiotique, 59, 60
Didésoxyribonucléotides, méthode de séquençage de l'ADN, 446-447
Différence d'un caractère, 23-24
Digitale, interactions de gènes, 105-106
Digitalis purpurea, exemple d'interaction entre gènes, 105-106
Dihybride, 28
Dimorphisme génétique, 37
Dioïques, plantes, 70
Diploïde, cellule, 59, 76
  complémentation, 370
  cycle, 78
  méiose, 58-62, 63
  mitose, 56-58, 63, 78
Diplotène, stade de la méiose, 59, 61
Disomie, 263-264
Dissection génétique, 8, 18, 41
  mutagènes, 201-203
  symboles, utilisation, 67-68
Distribution de Poisson, 157, 158
Distribution statistique, 819-823
DL, protéine, gradient de concentration, 758-760
dl, gène, 758-760
Doigts à zinc, 570, 571
Dominance incomplète, 92
Dominance, 92-93, 356-358
  impact sur la variance, 842-843
Dominant, 25
  homozygote, 27
D/V (dorso-ventral), axe, 748-750, 758-760
Double crossing-over, 133-134, 141
Double hélice, 316, 318-319
  représentation tridimensionnelle, 319-320
Double recombinant, 133-134

Down, syndrome de, 230-231, 232, 261-262
dpp, gène, 696, 702, 762-764
Drosophila hydei, chromosome X, 502, 504
Drosophila melanogaster(mouche des fruits)
aile recourbée (*curled*), variant, 18
axe du corps, formation, 754-760
bandes chromosomiques, 502
BCD, protéine, gradient de concentration, 756-758
carte génétique, 136
cartographie par délétions, 218, 219
chromosome 3, 503
chromosomes, 495-496
ClB, chromosome, 197, 198
copia, éléments transposables, 650
couleur de l'œil, 66, 67, 68-70, 233, 234
panachure induite par effets de position, 234, 235
crossing-over doubles, 131-134, 141
cycle vital, 65
dpp, gène, 696
embryon, 752-753
éthylméthane sulfonate, mutations induites, 201-203
FB, éléments transposables, 650-651
gènes conservés, 772
gènes homéotiques, 766-769
génétique du développement, 748-769. *Voir aussi* Plan d'ébauche, formation
groupes de gènes codant pour la coquille de l'oeuf, 695
gynandromorphe, 265
HB-M, protéine, gradient de concentration, 758
liaison génétique, 124, 131-134
morphogènes D/V, 758-760, 761-762, 771
morphogènes A/P, 755-758, 761-762, 765
mutation morphologique, 185
non-disjonction mitotique, 168
œil *Bar*, mutation, 222, 223
réplication de l'ADN, 334
sillon ventral, formation, 753-754
stade zygotique précoce, 752-753
surface du corps, 167-169
taille de l'œil, génotypes, 14-15, 16-17, 222, 223
Drosophila pseudoobscura
α-amylase, 785
estérase-5, 783-784
malate déshydrogénase, 785
xanthine déshydrogénase, 785
Ds, élément transposable du maïs, 657-658
Duchenne, dystrophie musculaire, 73, 231, 232
fréquence de mutation, 192
translocations chromosomiques associées, 231-232
Duplication(s)
chromosomique(s), 217, 220-224, 226, 227, 233
Duplications, mutations, 588-589
Dynéine, 722
Dysgénèse hybride, 651, 652
Dysplasie anhidrotique de l'ectoderme, 75
Dystrophie myotonique, 593

E2F, protéine, 728
Eco RI, 425-426, 427
Eco RII, 427
Edwards, syndrome de, 262
effet du chromosome de Philadelphie, 740, 741
Egalité, en génétique quantitative, 824-825
Elaphe guttata (couleuvre), couleur de la peau, 102-103, 104
Electrophorèse en champs alternés (pulsed field gel electrophoresis), en cartographie chromosomique, 522, 523
Electrophorèse, 92, 93
cartographie chromosomique, 522-523
construction de bibliothèques d'ADN, 435
fractionnement de l'ADN, 442-444
Elément activateur (enhancer) de transcription, 566, 568, 695
mise en évidence par un gène indicateur, 701
spécificité tissulaire, 568, 695-696
Eléments génétiques transposables, 638-660
chez *Drosophila*, 650-653
chez la levure, 650
chez le maïs, 656-660
chez les rétrovirus, 653-655
conséquences moléculaires, 646, 649
eucaryotiques, 650-660
excision imprécise, 648
excision précise, 648
intermédiaires d'ARN, 655-656
mécanismes, 644-646
procaryotiques, 638-650
remaniements et, 646, 648, 650
séquence d'insertion, 638-640
transposition conservative, 645-646, 647
transposition réplicative, 645
Empreinte parentale, 698-700
Empreintes d'ADN, 4, 509-511, 512
Endocrine, système de signalisation intercellulaire, 730
Endogamie, 791
Endogénote, 286
Enrichissement à la pénicilline, pour la sélection de mutations, 194
Enroulement de la coquille chez les escargots, 668, 669
Environnement et gènes, 11-17
Enzyme(s), 11
de restriction, 425-426, 449-451
de voies de biosynthèse, 342-343
défectueuses, 355, 356
fonction, 352-354
induction, 547-554
modèle de clé et serrure, 354
protéolytique(s), 347, 349
régulation génétique de synthèse, 342-343, 345-358
répression, 559-562
Enzymes de restriction, 425-426, 427
dans la construction de marqueurs d'ADN, 449-451
Enzymes protéolytiques, 347, 349
Epigénétique, hérédité, 698-700
Epiloia, fréquence de mutation, 192
Episomes, 283
Epistasie, 99-101
dominante, 105-106
récessive, 100, 101
Equipotentes, groupe de cellules, 734-736
Escargots, enroulement de la coquille 668, 669
Escherichia coli
ARN polymérase, 387
carte génétique, 301, 302, 303
circularité du chromosome, 281-283
cycle conjugatif, 284-286
Eco RI, 425-426
expression du gène de l'hormone de croissance humaine, 466
expression du gène de l'insuline, 464, 465
expression hétérologue de gènes eucaryotiques, 463-464
facteur de fertilité (F), 277-279
gal, gènes, 638-639
Hfr, souche, 281, 282
infection par des phages, 292-294, 295-296
insertion du facteur F, 283-284, 285
intégration du phage λ, 297-298
lysogène, souche ou cellule, 295-296
Meselson et Stahl, expérience, 323, 324
métabolisme du lactose, 546, 555
mutateurs, 612
mutation(s), 192, 407, 612
réparation, 602-611
origine de réplication, 328
production de somatostatine, 462-463
promoteurs, 387-388
réparation par excision de nucléotides, 604-605
réplication de l'ADN, 328-329
systèmes de recombinaison, 626-630
T1, phage, 194
traduction, 406
transcription, 406
tryptophane synthétase, 352-353
Estérase-5 de *Drosophila pseudoobscura*, 783-784
Etalement de bactéries, 276
Ethylméthane sulfonate (EMS), agent mutagène, 202, 596
Etiquetage, pour le clonage des gènes, 440, 442
Eucaryotes, 9
Euchromatine, 214, 500-501
Eugénique négative, 801-802
Euploïdie, 250-266
allopolyploïde, 254-257
polyploïde, 251-252, 254-258
tétraploïde, 253-254
triploïde, 252-253
Evénement mutationnel, 182
Evénements fortuits, 807-808
Evolution neutre, 808
Exconjugants, 280, 281, 282
Exogamie, 794
Exogénote, 286
Exon, 411
brassage, 413, 415
Exonucléase, correction sur épreuve à la réplication de l'ADN, 331-332, 333
Expression génique. *Voir aussi* Protéine(s)
chez *E. coli*, 463-464
chez les eucaryotes, 9, 10, 417, 418
chez *Salmonella*, 630, 631
spécifique du sexe, 705-712
Expressivité, 108-109
Extranucléaire, génome, 664-683
chez *Chlamydomonas*, 668-671

BCU ASU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

chez la levure, 672-678
chez les champignons, 666-668
chez les plantes supérieures, 665-666, 667
ségrégation cytoplasmique, 666, 667
vs. effets maternels, 668, 669

F'-duction (sexduction), 290
F, facteur de fertilité bactérien, 277-279, 289-290, 549-550
découverte, 280-281
situations, 283
transfert, 281
épisomes, 283
et circularité chromosomique, 281-283
F1, première génération, 24
Fabry, maladie, 591
Facteur 9 du complément, 413
Facteur de détermination testiculaire, 75
Facteur de fertilité. *Voir* F, facteur de fertilité
Facteur nécrosant tumoral (TNF), 578
Facteur sigma de l'ARN polymérase, 387-388
Facteurs d'initiation, 401
Facteurs de croissance, 732
Facteurs de relargage, 402, 404
Facteurs de transcription
action, 573, 574
agrafe à leucines, 570, 571
doigts à zinc, 570, 571
motif en hélice-tournant-hélice, 570
motifs en hélice-boucle-hélice, 572-573
motifs structuraux, 570-573
opérant en trans, 566, 568-573
régulation, 573, 575
régulation par les hormones stéroïdes, 573, 575
structure en domaines, 570
tests in vivo, 573
Facteurs opérant en trans, 566, 568-573
Fanconi, anémie, 612, 613
FaPy, ADN glycosylase, 606
Fardeau génétique, 97
FB, éléments transposables chez *Drosophila*, 650-651
Féminisation testiculaire, syndrome, analyse généalogique, 73
α-Fétoprotéine, évolution, 631-632
Feuillet plissé b, 348
Fibronectine, 577
Filaments intermédiaires, 720, 721, 722
Filtration, méthode d'enrichissement en mutants, 193-194
Flottement (wobble), 398
Fluctuation, test pour la sélection des mutations, 194-195
Fluctuations perturbant le cours du développement (ontogéniques), 16-17
Fluorescencence, mise en évidence d'hybridation in situ pour la cartographie chromosomique, 521-522
FMR-1, gène, 591, 592
Folliculaires, cellules, chez *Drosophila*, 751-752
Fonction cartographique, 158-159
Fonction de distribution, 820
Fondation, effet en génétique des populations, 807-808
Fougères, haploïdes-diploïdes, 81-82
Fourche de réplication, 326, 327, 331
Fréquence allélique, 781-782
Fréquence de mutation, 182, 191, 192
Fréquence des gènes, 781-782
taux de changement, 801-802
Fréquence des recombinants, 126-127, 135, 136, 156-159
Fréquence gamétique, 781-782
Fréquence relative,821
Fuseau mitotique, 723

G, protéines, 734
G_0, stade du cycle cellulaire
G_1, phase du cycle cellulaire, 725, 726
G_2, phase du cycle cellulaire, 725, 726
Gain de fonction, mutation, 186-187, 703-704
gal, gènes, 638-639
GAL4, protéine, 570
β-Galactosidase, 546-547
études sur la régulation, 470, 472
induction, 547-548
Galactoside transacétylase, induction, 547-548
Gale du collet, maladie, 473
Gamète, 78-79
Gamétophyte, 81
Gap, gènes, 762, 764
Gaz moutarde, dans la mutagénèse, 198-199
GCN4, protéine, 570
Gène(s), 26
action complémentaire, 103
action, 840-842
alignements en tandem, 506-507
amplification, 576-578
assortiment indépendant, 29
autonomes, 658
bcd, 755-758
candidat(s) responsable(s) d'une maladie, 536
cardinaux, 761-762
carte(s), 363, 364, 365. *Voir aussi* Cartographie chromosomique
clonage, 182, 272, 430-442, 531-534
électrophorèse, 442-444
étiquetage, 440, 442
par complémentation fonctionnelle, 439, 440, 441
par positionnement, 439-440, 441
sondes, 435-439
séquençage, 444-447
vecteurs, 430-434
vecteurs cosmidiques, 433
vecteurs d'expression, 434, 439
vecteurs dérivés du phage λ, 432-433, 436
vecteurs plasmidiques, 430-432
complémentation, 169, 369-373
complémentation intragénique, 373
conservation, 772
conversion, 623
de globine de l'anémie à cellules falciformes, 483, 484-485
de la mucoviscidose, 533-536
définition, 2
du profil de segmentation D/V, 764
du tryptophane, 559-562
dupliqués, 106, 107
effet maternel, 754-755
épistatique(s), 99, 100-101
et cancer, 199-201
et environnement, 11-17
évolution, 631, 632
excision-épissage, 412-416
expression alternative chez *Salmonella*, 630, 631
expression chez *E. coli*, 463-464
expression chez les bactéries, 463-464, 630, 631
expressivité, 108-109
extranucléaire(s), 644-683. *Voir aussi* Génome extranucléaire
familles
dispersées, 506
alignés en tandem, 506-507
fonction, 9, 10, 342-345
hypothèse «un gène-une enzyme», 342-343
fusion, et mutation de gain de fonction, 703-704
gap, 762, 764
groupe(s), 558-559
hb, 755-758
hémizygotique(s), 70
homéotique(s), 766-769
identification, 838-840
inactivation (knockout), 477-478, 772
indicateur(s), 466, 470, 472, 701, 702
interactions, 92-110
codominance, 92-93
complémentation, 102-108
couleur de la peau chez la couleuvre, 102-105
gènes dupliqués, 106-108
expressivité, 108-109
pigmentation chez la digitale, 105-106
dominance incomplète, 92
allèles létaux, 95-98
couleur du pelage chez les mammifères, 98-102
allèles multiples, 93-95
pénétrance, 108-109
pigmentation chez le poivron, 107-108
pelage pie, 109
suppression, 106
lacZ, 470, 472-476
liaison au sexe, 64-67, 70-76
liaison, 124-126
$\chi 2$, test, 137-138, 140
carte, 129-131, 135-139, 520-521. *Voir aussi* Cartographie chromosomique
chez *Cochliomyia hominivorax*, 131, 132
symbolisme, 127-128
transduction, mesure par, 300-301
sur le chromosome X, 128-129
marqueur(s), 839-840
modificateur, 101
mosaïques, 411, 412, 413
mutations, 182-203. *Voir aussi* Mutations géniques
non-autonome, 658
pair-rule, 764
paralogues, 769
pénétrance, 108-109
perles d'un collier, théorie, 358-359, 369
pléiotrope(s), 97
points chauds (de mutation), 367, 587-588, 590
polarité de segments, 764
rareté, 33
recombinaison interne, 363-364
recombinaison intragénique, 363-364
redondance, 576
région de régulation, 470, 472

régulateurs secondaires, 764
régulation d'expression, 546-578, 694-715
activateurs, 568, 695-696, 701
chez les bactéries, 558-559
chez *Drosophila*, dans la détermination du sexe, 705-709
chez les eucaryotes, 564-566
chez les mammifères, dans la détermination du sexe, 709-712
chez les phages, 562-564
dans la production d'anticorps, 712-715
effets sur le développement, 704-705
empreinte parentale, 698-700
facteurs de transcription, 568-573
5-méthylcytosine, 575
négative, 547-554, 559-562
paramutation, 698, 699
positive, 554-555
positive et négative, 555-558
post-transcriptionnelle, 575, 697-698
post-traductionnelle, 698
promoteurs, 567-568, 695
protéines régulatrices, 564, 566
répresseurs, 564
spécifique de tissus, 694-697
régulation post-transcriptionnelle, 698
régulés de façon coordonnée, 548
relation au phénotype, 342
relation avec la protéine, 345-358. *Voir aussi* Protéine(s)
représentation symbolique, 67-68
ségrégation, 26, 167-168
séquençage, 444-447
synthèse, 462, 463
topologie, 366-369
Gène, remplacement (transplacement), 465
chez la Souris, 477-478
Génération(s)
alternance, 78, 80-82
parentale, 24
première (F_1), 24
Gènes à effet maternel, 750
dans la formation de l'axe du corps, 754-755
Gènes agissant zygotiquement, 750
Gènes contrôlés de façon coordonnée, 548
Gènes indicateurs, 466, 701, 702
Gènes, paire, 26, 27
assortiment indépendant, 29-30
ségrégation, 26
Génétique du développement, 704-705, 748-775. *Voir aussi* Plan d'ébauche
de la Souris, 769-775
détermination du sexe chez *Drosophila*, 705-709
détermination du sexe chez les mammifères, 709-712
plan d'ébauche chez *Drosophila*, 748-769
production des anticorps, 712-715
Génétique inverse, 464-465
Génétique quantitative, 818-846
corrélation, 823, 825
covariance, 823, 825
déviation standard, 822-823
distribution des phénotypes, 826-830
distributions, 819-823
échantillons, 826
égalité, 824-825
fréquence relative, 821
héritabilité, 830-831
mode, 820, 821
moyenne, 821
norme de réaction, 828-830
populations, 826
régression,
variance, 821-822, 825
Génie génétique, 4, 8-9. *Voir aussi* Ingénierie génétique
chez la levure, 467-472
des animaux, 475-478
des plantes, 473-475
Génome, 2. *Voir aussi* Cartographie chromosomique
extranucléaire, 663-683. *Voir aussi* Extranucléaire, génome
taille, 494
Génomique, 520-538. *Voir aussi* Cartographie chromosomique
analyse par délétions, 532-533
assignation des loci à des chromosomes, 520-524
caractérisation génotypique des spermatozoïdes, 528
cartographie méiotique, 524-529
cartographie physique, 530-536
clonage par positionnement, 533-536
de *Saccharomyces cerevisiae*, 536, 538
du chromosome Y, 532-533, 534
électrophorèse en champs alternés, 522, 523
Haemophilus influenzae, 536, 537
homozygotie, méthode d'analyse, 528-529
hybridation in situ de sondes fluorescentes, 521-522
hybridation in situ, 521-522
hybrides somatiques Homme-rongeur, 522-524, 525, 529-530
marqueurs microsatellites, 527-528
marqueurs minisatellites, 527
mucoviscidose, 534-535
polymorphisme de longueur de séquences simples, 526-527
polymorphisme de longueur des fragments de restriction, 526
profil de bandes d'un clone, 531
remaniements, points de rupture, 522
séquençage aléatoire, 532, 533
séquençage des génomes, 536-538
séquences marqueurs, 531, 532
tri de chromosomes, 532, 533
Génotype, 76
en génétique quantitative, 826-828
et environnement, 11-17
et phénotype, 14, 342
homozygote, 27
norme de réaction, 14-16
Germinale, mutation, 183, 184
Gerstmann-Strussler-Scheinker, maladie, 358
β-Globine, gène, 483, 484-485
promoteur, 567
Glutamine, 346
Glutamique, acide, 346
Glycinamide riboside transformylase, 577
Glycine, 346
Glyphosate, résistance des plantes, 475
GO, système, 607, 608, 611
Gradient de densité en saccharose, 389-391
Gradient de transfert, pendant la conjugaison bactérienne, 286-287
Granulocyte-monocyte, facteur de simulation (GM-CSF), 578
GRK, protéine, 760, 761
grk, gène, 758-760
Groupes sanguins ABO, 93-94
Guanine, 316, 317
Gynandromorphes, 264-266
Hae III, 427
Haemophilus influenzae
cartographie chromosomique, 532, 533
séquençage du génome, 536, 537
Haploïde, cellule, 59, 78
croisements génétiques, 79, 81
cycle vital, 78-82
Haploïdes et diploïdes, organismes avec alternance de stades, 80-82
Haploïdisation, 170
Haplotype, 781-782
Hardy-Weinberg, équilibre, 790-791
Haute fréquence de transduction, lysat, 300
hb, gène, 755-758
HB-M, gradient, 758
hb-z, gène, 764
Hélicases, dans la réplication de l'ADN, 327, 330-331, 332
Hélice α, 347
Hélice, double, 316, 318-319
Hélice-boucle-hélice, motif, 572-573
Hélice-coude-hélice, motif, 564, 566, 570
Hémiptères, chromosomes, 66
Hémizygotique, gène, 70
Hémoglobine
de lapin, 408
électrophorèse, 92, 93
structure, 349
substitutions d'acides aminés, 352, 407
variants, 222-223, 224, 592
Hémoglobine A, 12, 92-93, 350-352
Hémoglobine S, 12, 92-93, 350-352
Hémoglobinopathie, dépistage, 482-483
Hémophilie, 190, 192
analyse d'arbres généalogiques, 72, 73
Hérédité
autosomique, 71
liée à l'X et à l'Y, 70, 76
liée à l'X, 70, 70-73
liée à l'Y, 70, 75
maternelle, 665, 667-668
mendélienne, 24-27, 76-78
chez l'homme, 32-37
modifiée, 98-109
par mélange, 22, 789
particulaire, 22, 26. *Voir aussi à* Gène(s)
principe, 780
pseudoautosomique, 76
théorie chromosomique, 62-70
Héritabilité
au sens large, 832
définition, 843

CU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

en élevage, 845-846
en génétique quantitative, 830-831
estimation, 832
interprétation, 833-835
quantification, 831-833
Héritabilité et amélioration des espèces, 845-846
Hermaphrodites, espèces, 70
Hermaphrodites, fleurs, 70
Hershey et Chase, expérience de, 314-315, 316
Hétérocaryon, 169
binucléé, 522
de *Neurospora*, 357-358
test, 668
Hétérochromatine, 214, 215, 500-501
Hétérochronie, 698
Hétérodimères, 572
Hétérogamétique, sexe, 70
Hétéromorphe, paire, 63-64
Hétéroplasmon, 671
Hétérozygote, 27
Hétérozygotie, 782
Hfr, souche bactérienne, 281, 282, 286
Himalayenne, souris, 100
*Hin*d II, 427
*Hin*d III, 427
his, groupe de gènes, 558-559
his, opéron, 662
Histidine, 346
Histogramme de fréquences, 820
Histones, gènes, 576
Histones, protéines, 497
HIV, virus d'immunodéficience humaine, 6
Hmu-ADN glycosylase, 606
Holliday, modèle de recombinaison, 619-625
mise en application, 620-625
structure chi, 619, 620, 621
Holoenzyme, 327, 330, 331
Homéoboîte, 766
Homéodomaine, 766
Homéotie, 766
Homéotiques, gènes, 766-769
Homodimère(s), 572
Homogamétique, sexe, 70
Homogentisique, acide, oxydase, 356
Homozygote dominant, 27
Homozygote récessif, 27
Homozygote(s), 27
production par autofécondation, 39
Homozygotie
à la descendance, 795
en cartographie de génomes, 528-529
Hordeum, variétés, 251
Horloge moléculaire, 808
Hormone de croissance
de souris, 479, 480
expression chez *E. coli*, 466
Hormones, 729-730
Hormones, élément(s) de réponse, 731
Hox, gènes, analyse génétique par inactivation, 772-775
Hpa II, 427
Huntington, maladie,
fréquence de la mutation, 192
profil de transmission héréditaire, 35
Hybridation in situ, dans la cartographie des chromosomes
Hybride, 27
Hybride, dysgénèse, chez *Drosophila*, 651, 652
Hybrides somatiques Homme-rongeur, en cartographie chromosomique, 522-524, 525, 529-530
Hydrogène, liaisons dans la double hélice d'ADN, 318
Hydroxylamine, agent mutagène, 596
Hydroxyphénylpyruvique, acide, oxydase, 356
Hyphes, 79
Hypophosphatémie, profil de transmission héréditaire, 73
Hypothèse des facteurs multiples, 828
Hypothèse nulle, 137

I, gène, 546, 549
ICR, composés, dans la mutagénèse, 597
Ig-c-myc, fusion de gène, dans le lymphome de Burkitt, 741-742
Immunoglobulines
chaînes lourdes, 577
gènes, 771
voie de production, 712-715
Immunologique, polymorphisme,783
In vitro, mutagénèse, 460-462
dirigée, 461-462
substitution de nucléotides, 460-461
Inducteurs, 547
Induction, 547
enzymatique, 547-554
Induction zygotique, 297
Inhibition latérale, 734-736
Insomnie familiale fatale, 358
Insuline
expression dans *E. coli*, 464, 465
séquence d'acides aminés, 347
Insuline bovine, séquence des acides aminés, 347
Int, protéine, 630
Intercalants (agents), dans la mutagénèse, 597
Interférence entre chromatides, lors du crossing-over, 141
Interférences dans les crossing-over chromosomiques, 134-135
Interféron *b*, 578
Interleukine 1, 578
Interphase, 56,57
méiotique, 77
Interruption de gènes, 465, 467, 470
chez la Souris, 477-478
Introns, 9, 411
Inversion chromosomique, 217, 224-228. *Voir aussi à* Chromosomes, inversions
IR (séquences répétées inverses), 641
IS (séquences d'insertion, ou éléments), 638-640
identification, 639-640
orientation, 640
Isoleucine, 346

Kearns-Sayre, syndrome de, 591
Kennedy, maladie de, 593
Kératine, 722
Khorana, méthode de, pour la synthèse de gènes, 462
Kinésine, 722,723
Kininogènes, 577
Klenow, fragment de, 460
Klinefelter, syndrome de, 261
kni, gène, 762, 764
Knockout mouse, 477-478
Kr, gène, 762, 764
Kuru, 358

lac, inducteur, 547-549
lac, opérateur, 550, 553-554
lac, opéron
régulation, 546-547, 556, 557
négative, 547-554
positive, 554-555
répression catabolique, 554-555
lac, promoteur, 552, 553
lac, répresseur, 547, 553-554, 565, 566
lacI, gène, mutations, 587-588, 589, 590, 593, 594
Lactose, métabolisme chez *E. coli*, 546-555
lacZ, gène, 470, 472, 476
Laison (de gènes) au sexe, 64-67, 70-76
Lamine, 722
Lapin
gène C, 407-408
hémoglobine, 407-408
Larve de *Drosophila*, 753-754
Lasso, modèle du, pour l'épissage des gènes, 412, 413
Leader, séquence (séquence initiale), 560
Lebistes, chromosome Y de, 75
Leptotène (stade), 58, 60
Leucémie, chromosome de Philadelphie et, 740, 741
Leucine, 346
Levure,
cartographie des chromosomes, 166-167
chromosome 3 de, 536, 538
chromosomes artificiels, 213-214
complexes cycline-CDK, 727
cycle cellulaire, 726, 727
cycle vital, 672
élément Ty, 650, 655-656
génie génétique, 467-472
génome mitochondrial, 672-678
carte de restriction, 676
cartographie, 673-678
cartographie de mutations petite, 674-675
cartographie par restriction, 676
mutants petite, 672, 674-675
plasmide deux microns, 680
vecteurs, 468-472
LexA, répresseur, 564
Liaisons peptidiques, 345, 346
Ligand, 729
Lignée pure, 23
LINES (long interspersed elements), 511
Linium tyrinum, complexe synaptonémal, 62
Linkage (liaison des gènes), 124-126
carte du, 129-131, 135-139. *Voir aussi à* Cartographie chromosomique
chez *Cochliomyia hominivorax*, 131, 132
fréquence de mutation, 192
induction de mutations, 197-199, 201-203
irradiation, mutations induites, 198
localisation de l'ARNm, 758, 759
norme de réaction, 14-15
organisateur nucléolaire, 507-508
ovocyte, 760-761
ovogénèse, 751-752
P, élément transposable, 651-653
panachure produite par des effets de position, 233, 234
plan d'ébauche, 748-750
scute, inversions, 507

segmentation, gènes, 763, 764
sur le chromosome X, 70, 75
sur le chromosome Y, 70, 75
symbolisme, 127-128
Loci influençant des caractères quantitatifs, 839-840
analyse de liaison, 841-842
Locus d'un gène, 129, 131
Locus génique, 129, 131
Loi de l'assortiment indépendant, 29
Loi de la ségrégation égale, 26
Luciférase, gène, 475
Lutte pour la vie, 797-802
Lymphome de Burkitt, translocation chromosomique, 233, 234, 235
Lysogène, 295-296
production de, 299-300
Lysogénie, 295-296, 297

Maïs
alternance des générations, 81, 82
chromosomes, 216
détection des mutations, 187-188, 191
élément *Ds*, 657-659
éléments de contrôle, 656-660
gène *Wx*, 658
haploïde-diploïde, 81, 82
mosaïcisme chez le, 660
rapports mendéliens, 31, 32
stérilité cytoplasmique du mâle, 681-682
Maladies génétiques, 4-6, 354, 355. *Voir aussi* Cancer
aberrations chromosomiques, 5, 6
cartographie chromosomique, 533-536
dépistage, 482-486
diagnostic, 482-486
héréditaires, 5-6
liées à l'X, 71-73
mitochondriale, d'origine, 680, 681
somatiques, 6
Manx, phénotype chez le chat, 97
Marchantia polymorpha, génome chloroplastique, 678-680
Marche sur le chromosome, 439-441
Marquage court avec chasse (pulse chase), expérience de, 284
Marqueur d'ADN, 142, 449-451, 525-528
Marqueur(s) génétique(s), 41
Marqueurs d'ADN, 142, 525-528
production au moyen d'enzymes de restriction, 449-451
Médecine
génétique en, 4-6, 32-37, 406, 407
légale, 510, 511
Médemycine, production bactérienne de, 467
Méderhodine A, production bactérienne de, 467
Méiocyte, 56, 78
Méiose I, 58-59, 60
Méiose, 56, 58-62, 77, 78
analyse des tétrades, 159-167
analyse, 160-162
anomalies, 68-70
chiasma à la, 125
comparée à la mitose, 63
crossing-over, 125
dans les cellules haploïdes, 79, 159-167
Méiospores, 56
Melandrium album, chromosomes sexuels, 71
Mendel, Gregor, 2, 22-32. *Voir aussi à* Pois (*Pisum sativum*)
Mérodiploïde, 290
Mérozygote, 286
Meselson-Radding, modèle de recombinaison, 622, 623
Meselson-Stahl, expérience de, 323, 324
Métabolisme, anomalies héréditaires du, 186
Métaphase méiotique I, 59, 60
Métaphase méiotique II, 59
Métaphase mitotique, 57, 58
Métastase, 200
Méthionine, 346
5-Méthylcytosine
dans la régulation de la transcription, 575
en tant que point chaud génétique, 590
Microfilaments, 720, 721, 722
Microsatellite, marqueurs dans la cartographie chromosomique, 527-528
Microtubules, 720, 721, 722
Migration de branchement à la recombinaison, 619-620
Migration, variation due à la, 793
Milieu minimum, 186, 276
Mille-feuille (*Achilea millefolium*), norme de réaction, 15, 16, 17
Mimétisme mullérien chez les papillons, 798, 799
Mimulus guttatus, pollinisation croisée chez, 23
Minisatellite, ADN, 509-511
Minisatellite, marqueurs, en cartographie chromosomique, 527
Mitochondrial, génome, de la levure, 672-678
Mitose
chez les cellules diploïdes, 56-58, 63, 78
chez les cellules haploïdes, 78
comparée à la méiose, 63
Mode, en génétique quantative, 820, 821
Modificateur, gène, 101
Monohybride, 28
Monoploïde, 250-251
Monosomie, 258, 259-260
Morphogène, 748
Morphologique, mutation, 184, 185
Mosaïcisme, résultant de mutagénèse par des transposons, 660
Mosaïque, 168
Mosaïque sexuelle, 264-266
Mouche des fruits. *Voir Drosophila melanogaster*
Mousse
croisement chez la, 83
haploïde-diploïde, 81-82
Moyenne, en génétique quantitative, 821
Mucoviscidose
gène, 533-536
transmission, 34
Mutagènes, 197-199
carcinogènes et, 600-612
dans la dissection génétique, 201-203
réversion, 600
spécificité, 593, 594
Mutagénèse à saturation, 202, 502, 503
Mutagénèse dirigée in vitro, 461-462
Mutagénèse, 593-600
acide nitreux,
aflatoxine B1, 599-600, 601
agents alkylants dans la, 596, 610
agents intercalants, 597
défauts d'appariement spécifique, 596-597
in vitro, 460-462
incorporation d'analogues de bases, 593-595
lumière ultraviolette, 599, 603
réparation par recombinaison, 609
à saturation, 202, 502, 503
système de contournement SOS, 597-600
système de réparation des défauts d'appariement, 607-609
système GO, 607-608
voie de réparation par excision de base, 605-606
voie de réparation par les endonucléases AP, 606-607
voies d'excision-réparation, 604-607
Mutant(s)
réverse, 182
types de, 184-187
Mutateurs, 612
Mutation polaire, 548, 638
Mutation suppresseur, 393, 402, 404-405
Mutation(s), 182-203. *Voir aussi à* Mutation(s) chromosomique(s)
amélioration par, 203
biochimique, 186
cancer et, 199-201
ciblée, 477-478
colinéarité des, 352, 353
conditionnelle, 184
conférant la résistance, 194-196
dans le gène *lacI*, 587-588, 589, 590, 593, 594
dans les cellules cancéreuses, 738-742
dans les maladies, 591-593, 680, 681
de gain de fonction, 186-187, 703-704
de glissement de cadre (ou frameshift), 394, 587-588, 600
de perte de fonction, 186, 187
de substitution de nucléotide, 460-461
dégats oxydatifs à l'ADN, 590
délétion, 588-589, 591
dépurination, 589-590
désamination, 590
dirigée, 461-462
dominantes, 183
duplication, 588-589, 591
erreurs de réplication de l'ADN, 586-589
fonctions protéiques, 350-352
fréquence des, 182, 191, 192
germinales, 183, 184, 189-190
incidence des, 263
induites, 197-199, 585, 593-600
cancers et, 600-601
induites chimiquement, 198, 201-203
induites par l'éthylméthane sulfonate, 202
induites par les radiations, 198
instable(s), 656, 658
leaky (bradytrophe), 186, 187
létale, 184, 185
mitochondriales, 680, 681
morphologique, 184, 185
nulle, 186, 187
opérateur, 550-552
période de sensibilité aux, 184
phages et, 360-369
points chauds, 587-588,590
polaire, 548, 638
ponctuelle, 182, 198
promoteur, 552, 553

récessives, 183
réparation, 601, 603-611
par excision, 604-607, 611
par excision de bases, 605-606
par excision de nucléotide, 604, 605
par la voie de l'ADN glycosylase, 605-606, 611
par les endonucléases AP, 606-607, 611
par le système GO, 607, 608, 611
par recombinaison, 609
post-réplicative, 607-610, 611
par le système de réparation des défauts d'appariement, 607-609
réverse, 182, 363, 584-585
réversion, 600, 603
site de, 363, 364, 366-363
somatique, 182-183
spécificité, 593, 594
taille des, 369
test cis-trans des, 373
spontanées, 585, 586-593
suppresseur, 393, 402, 404-405, 585
extragénique, 585
intragénique, 585
systèmes de sélection des, 191-197
à partir de cultures, 196-197
par enrichissement à la penicilline, 194
par enrichissement par filtration, 193-194
par la technique des répliques
par les bactériophages, 194-196
par les techniques microbiennes, 191-192
par le test de fluctuation, 194
par réversion d'une auxotrophie, 192-193
taille des, 369
taux de, 191, 196, 792
thermosensible, 355-356
transition, 586, 600
transversion, 586, 600
variation due aux, 792-793
Mutation(s) chromosomique(s), 211-235, 249-268
applications à l'agriculture, 266-267
changeant le nombre de chromosomes, 249-267
allopolyploïdie, 254-257
aneuploïdie, 258-266
associée au syndrome de Down, 261
associée au syndrome d'Edwards, 262
associée au syndrome de Klinefelter, 261
associée au syndrome de Patau, 262
associée au syndrome de Turner, 260
autotétraploïdie, 253-254
chez l'Homme, 260, 261-263, 266
dans l'amélioration des plantes, 266-267
disomique, 263-264
euploïdie, 250-257
incidence, 262-263
monoploïdie, 250-251
monosomique, 259-260
nullisomique, 259
polyploïdie, 251-252, 257-258
triploïdie, 252-253
trisomique, 261-263
dans les cellules cancéreuses, 220, 221, 266
définition, 250
structurale(s), 216-234
délétion(s), 216, 217-220
duplication(s), 217, 220-224
dans l'évolution, 234, 235
analyse de tétrades, 234
translocation(s), 217, 228-234
Mutations de résistance, sélection, 194-196
Mutations et élevage, 203
mutM, gène, 607, 608
MutY-ADN glycosylase, 606
Myélogène, leucémie chronique (LMC)
Myéloïde, leucémie chronique aneuploïdie, 266
Myoglobine, 346, 349
Myosine, 722
chaînes légères, 577
chaînes lourdes, 577

Nail-patella, syndrome de, fréquence des mutations, 192
Neurofibromatose, 232
mutation dans, 189, 190, 192
Neurones, la protéine de prion du scrapie dans les, 360
Neurospora (moisissure du pain), 161, 186
auxotrophes, 343-345
cartographie chromosomique, 526
cartographie par rapport au centromère, 162-166
croisements, 79, 81
cycle de vie, 79, 80
hétérocaryons, 357-358
mutations biochimiques, 186
mutations, 201, 202, 343-345, 357-358
identification, 190-191
fréquence, 192
poky, 666-668
remaniements chromosomiques, 234, 235
sénescence, 682
voie biosynthétique de l'arginine, 343-345
Neutralité adaptative, 804
NF-$_K$B, activationde, 257
Nitrosoguanidine, dans la mutagénèse, 596
Nodule (puff) chromosomique, 215
Non-disjonction, 69, 168
Non-disjonction mitotique, 168
Norme de réaction, 14-16
chez *Achillea millefolium*, 15, 16, 17
chez *Drosophila melanogaster*,14-15
dans les populations naturelles, 836
en génétique quantitative, 828-830, 835-838
Northern, transfert de, 443
Nucléoïdes des organelles, 683
Nucléoles, 58
Nucléoside, 316
Nucléosomes, 497
Nucléotide, 316, 317
Nullisomie, 258, 259

Ocre,codon, 399
Œil, couleur chez *Drosophila melanogaster*, 66, 67, 68-70, 233, 234
Oiseaux, albinisme, 99
Okasaki, fragment d', 330
Oligonucléotides
comme sonde, 437, 461-462
dans la mutagénèse dirigée, 461-462
dans la synthèse des gènes, 462-463
pour l'inhibition de la production d'une protéine, 406, 407
Oncogènes, 737, 738, 739-742
Oncoprotéine, 740
Opale, codon, 399
Opérateur, 546, 550-552
Opéron(s), 546-564
ara, 555, 557-558
lac, 546-555
phage λ, 562-564
trp, 558-562
Organisateur nucléolaire (ON), 9, 213
Organisme, 2
diploïde, 78
environnement, 11-17
génotype, 14
haploïde, 78-82
haploïde-diploïde, 80-82
phénotype, 14
transgénique, 466-467, 476, 479, 480
Orge (*Hordeum*), 251
Osmaronia dioica, 70
Oursins de mer, gènes d'histones de, 576
Ovalbumine de Poulet, organisation du gène en mosaïque, 411
Ovocyte
microtubules d', 760
Xenopus, 407-408
Ovogenèse chez *Drosophila*, 751-752
Oxydase de l'acide homogentisique, déficience, 356
Oxydase de l'acide hydroxyphénylpyruvique, déficience, 356

P, cytotype, dans la dysgénèse hybride, 651
P, élément
de *Drosophila*, 651-653
régulation de, 696-697
p-21, lésions de l'ADN et, 728-729
p-53, lésions de l'ADN et, 728-729
p53, gène,600-601, 743
Pachytène, méiotique, 59, 61
Pair-rule, gènes, 764
Pajamo, expérience de, 549-550
Palindrome, séquence d'ADN, 426
Panachure, 168
Panachures par effet de position, 233, 234, 500-501
Papillon(s), mimétisme Mullerien, 798, 799
Paramutables, allèles, 698
Paramutagéniques, allèles, 698
Paramutation, 698
Parentale, empreinte, 698-700
Parentale, génération, 24
Parenté, génétique quantitative, 830-831
Particules de phages défectifs, 299, 300
Patau, syndrome de, 262
Paysage adaptatif, 804-806
PD-ADN glycosylase, 606
Pelage, couleur chez les mammifères, 98-102
Pénétrance, 108-109
Période de sensibilité, 184
Perméase, 546, 547
Petites particules ribonucléiques nucléaires (snRNP), 412, 413
Petunia, 258
Phage Mu, 644
Phage(s), 276, 291-298

BASIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

à simple brin, pour le clonage des gènes, 434
auxilliaire (helper), 299, 360
croisements, 292-295
mutations réverses, 363
plages de lyse des descendants, 294
sélection après, 362-363
cycle vital, 359-360
défectif, 299, 300
infection bactérienne par, 291-292, 293
λ, 297, 299-300
carte génétique de, 563
crossing-over chez, 618
pour le clonage de gènes, 432-433, 436
recombinaison spécifique de site chez, 630
régulation de l'opéron, 562-564
site d'attachement, 298
lytique, 296
mu, 644
mutations chez, 360-365
complémentation, 371-373
cartographie par délétion, 364-367
sites de, 364-369
topographie des, 366-370
P1, 299
P22, 299
plage de lyse de, 292, 293, 360-361
pour la sélection de mutations, 194-196
pour le clonage de gènes, 432-433, 434
spécificité d'hôte, 292, 360
T-pair, 291
cartes génétiques des, 294-295
T1, 194
T2, 192, 292-295
T4, 360, 361
cartographie de, 364-367
cartographie par délétion, 364, 366, 367
codon stop, 398-39399
complémentation chez, 371-372
mutants *r*, 360-361
topographie, 366-370
tempéré, 296
transducteurs, 298-299
virulents, 296
Phalène du groseiller (*Abraxas*), couleur des ailes, 64-65
Phalène Io, gynandromorphe, 265
Phénotype, 24, 27, 76
caractéristique et, 24
dominant, 27
en génétique quantitative, 826-830
environnement et, 11-17
fluctuations au cours du développement et, 16-17
génotype et, 14, 342
mosaïque, 74-75
récessif, 27,
variation, 16-17, 37
variation continue, 37
variations aléatoires, 16-17
Phénylalanine hydroxylase, déficience en, 356
Phénylalanine, 346
Phénylcétonurie (PCU), analyse généalogique, 33, 34
Philadelphie, chromosome de, 740, 741
Phosphodiester, liaisons, 316, 318
Photolyase, 603
chez *E. coli*, 611
Pics adaptatifs multiples, 804-806
Piégeage d'éléments activateurs de transcription, 701-703
Pili sexuels, 284, 285
Pilosité du bord de l'oreille, 75
Pilus (pili)
des bactéries, 277
F, 284
Plan d'ébauche, 748
Plan d'ébauche, formation, 748-775
boucles de feedback, 750
chez *Drosophila*, 748-76
chez la souris, 769-775
étapes, 749
gastrulation , 753-754
gènes conservés dans, 772
gènes de régulation secondaires, 764
gènes du nombre de segments, 763, 764
gènes homéotiques, 766-769
gradient BCD dans, 756-758
gradient HB-M dans, 758
information de position, 748-750, 754-755, 761-762
localisation des ARNm, 758
morphogènes A/P, 755-758, 761-762, 765
morphogènes D/V, 758-760, 761-762, 771
mutation génique de, 750-751
ovogénèse dans, 751-752
polarité de l'ovocytes, 760-761
segments, 749, 766-769
zygotes, 752-753
Plante de tabac, autopolyploïdie, 253
Plantes
amélioration génétique des, 37, 40-42
dioïque, 70
galle du collet des, 473
génétique mendélienne des, 37, 40-42
haploïde-diploïde, 80-82
hérédité extranucléaire des, 665-66, 667
hermaphrodite, 70
ingénierie génétique des, 473-475
monoïque, 70
monoploïde, 250-251, 252
Plasmide pBR322, pour le clonage de gènes, 430-434
Plasmide(s), 283
extragénomique, 680-683
levure, 467-472
pour le clonage de gènes, 430-434
Ti, 473-475
Plasmides porteurs de centromère, 470, 472
Plectritis congesta, 12
Pléiotropiques, gènes, 97
Points chauds (hot spots), 587-588, 589
Points de contrôle, dans le cycle cellulaire, 729
Pois (*Pisum sativum*), 22
caractères, 23-24
croisements dihybrides, 28-30
croisements réciproques, 24-27
description, 22
interactions de gènes, 103
lignées pures, 23
Pois de senteur, liaison génétique chez le, 124
Poissons, polyploïdes, 257
Poivrons, couleur des, 107-108
Poky (mutant de *Neurospora*), 666-668
Polarité
dans la recombinaison, 624
de l'ovocyte, 760-761
Polarité des segments, gènes de, 763, 764
Pollinisation croisée chez *Mimulus guttatus*, 23
Polycomb, groupe des gènes, 768
Polydactylie, analyse généalogique, 36
Polygènes, 828
Polymérisation, réaction de, 327
Polymorphisme chromosomique, 783
Polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP)
dans le diagnostic des maladies génétiques, 484-486
en cartographie chromosomique, 526
Polymorphisme de longueur des séquences simples (SSLP), en cartographie chromosomique, 526-527
Polymorphisme de séquence de l'ADN, 784-787
Polymorphisme des protéines, 783-784
Polymorphisme, 485, 782
chromosomique, séquence d'ADN, 784-787
équilibré, 802-804
génétique, 37
immunologique, 783
protéine, 783-784
Polypeptide, 345
polyploïdes, 251-252, 257-258
Polypose multiple du gros intestin, fréquence de mutation, 192
Polytène, chromosome, 214-216
Pont (branchement) entre chromatides, à la recombinaison, 619
Population, en génétique quantitative, 826
Populations (génétique des), 780-811
appariement par assortiment positif, 794-797
changement de fréquence d'un gène, 801-802
endogamie, 794-797
événements fortuits, 807-808
la révolution de Darwin et, 780
lutte pour la vie, 797-799
origine de nouvelles fonctions, 794
pics adaptatifs multiples, 804-805
pics adaptatifs, 810-811
polymorphisme chromosomique, 783
polymorphisme des protéines, 783-784
polymorphisme des séquences d'ADN, 784-787
polymorphisme équilibré, 802-804
polymorphisme immunologique, 783
répétitions en tandem, 785,786
sélection en, 797-802
artificielle, 805-807
directionnelle, 809-810
spéciation, 811
variation complète de la séquence,785-786
variation des sites de restriction, 784-785
variation en, 780-789
entre populations, 787-788, 808-810
migration et, 793
morphologique, 782-783
mutations et, 792-793
quantitative, 788-789
recombinaison et, 793
reproduction sexuelle et, 789-791
sources de, 791-797
Poulet, motif du plumage, 65
Prader-Willi, syndrome de, 700

Première génération, profil de ségrégation dans l'analyse de tétrades, 163, 165
Première loi de Mendel, 26, 76
Prémutations, 591, 592
Préprotachykinine, 577
Primase, 329
Primosome, 327, 329
Prions, maladies dues aux, 358
Procaryotes, 11, 276. *Voir aussi à* Bactéries
Produit, règle du, 31
Profil de ségrégation à la deuxième division, dans l'analyse des tétrades, 163-166
Proflavine, en mutagénèse, 597
Proline, 346
Promoteur, 387-388, 547, 567-568, 695
  lac, 552, 553
  mutations dans le promoteur, 552, 553
Promoteur, complexe fermé, 388
Promoteurs-proximaux, éléments, 566
Prophage, 295-296
  site d'attachement bactérien, 297-298
Prophase
  méiotique, 77
  mitotique, 57, 58
Prophase I méiotique, 58-59, 60
Prophase II méiotique, 59, 61
Propositus, 32
Protéine activateur du catabolisme (CAP), 554-555
Protéine RB, 728
Protéine répresseur, 546, 564, 566
Protéine(s), 11, 345-358, *Voir aussi à* Enzyme(s)
  Adaptateur, 733
  Allostérique, 552
  banques d'expression, 438, 439
  changements de conformation, 730
  chromatographie à deux dimensions des, 349, 350
  dans le système de signalisation intercellulaire, 730
  empreinte digitale, 349, 350
  épissage des, 414, 415
  évolution, 413
  fibreuse(s), 346
  G, 734
  GAL4, 570
  GCN4, 570
  génétique inverse des, 464-465, 467
  globulaire, 345
  hélice-tournant-hélice, motif en, 564, 566
  histone, 497
  mutations géniques et fonctions des, 350-352
  prion, 358, 359
  régulatrice(s), 564, 566
  répresseur, 546, 564, 566
  séquence d'acides aminés, 347, 349, 352, 353
  sondes pour, 437-439
  structurale(s), 11
  structure des, 345-348
  structure primaire des, 345
  structure quaternaire, 346, 348
  structure secondaire, 345-346, 347, 348
  structure tertiaire, 346, 348
  synthèse des, 399-406, 416-417, 418
    blocage de, 406, 407
    étape d'élongation, 402, 403
    étape d'initiation, 401, 402
    étape de terminaison, 402, 404-405
    facteurs de relargage, 414, 415
    mutations suppresseur de non-sens dans, 402, 404
    régulation, 694-698
    séquence signal, 402
    sites de liaison des ribosomes, 402
    vue d'ensemble, 405-406
Protéines G, 734
Protéines kinases cyclines dépendantes, 727-729
  cibles, 727-728
  contrôles négatifs des, 728-729
Protéines prions, 358, 359
Protenor, chromosomes de, 66
Proto-oncogènes, 183, 199, 740
  mutations, 199-201
  translocation, 233, 234
Protoplastes, 257,
Prototrophique, microorganisme, 186
Pseudodominance, 218
pUC, plasmide pour le clonage de gènes, 430-434
Purine, 316, 317
Pyrimidine, 316, 317

R, facteurs, 641
Radiations et mutations, 198, 599
Raphanobrassica, 254-255
Rapports d'allèles (rapports génétiques), 356
  calcul, 30-32
ras, gène, 739, 740
Réaction de polymérisation en chaîne(PCR), 448-449, 484
Réappariement, 505
*rec*A, gène, 564, 565
Récepteur de l'EGF (EGFR), 740, 741
Récepteur des lipoprotéines de faible densité, gène du, 413, 414
Récepteurs, 729
  hormones stéroïdes, 730-730
  transmembranaire, 732-736
Récessive, 25
  homozygote, 27
Récessivité, 356-358
Recombinaison mitotique, 169
  chez les fungi,169-171
Recombinaison, 126-127, 618-632
  ADN hétéroduplex et, 619, 620
  cassure de l'ADN et, 618
  chez les champignons, 169-171
  chiasma, 618-619
  co-conversion, 625
  comparée à la complémentation, 371-372
  conversion de chromatides, 622-624
  conversion de demi-chromatides, 622-624
  conversion génique, 623
    crossing-over et, 624-625
  duplications au cours de la, 631, 632
  échanges de simples brins effectués par la protéine RecA, 627
  évolution des gènes et, 631, 632
  généralisée, 618-619
  interchromosomique, 126-127
  intermédiaires d'ADN, 619, 620, 625, 626
  intrachromosomique, 127, 128
  mécanismes enzymatiques, 619, 620, 626-630
  méiotique, 126
  migration de branchement, 619-620, 627, 628
  mitotique, 169-171
  modèle de Holliday, 619-625
    application, 620-625
  modèle de Meselson-Radding, 622, 623
  modèle de rupture-réunion à double brin, 628-630
  polarité dans, 624
  production d'ADN à simple brin, 626-627
  remaniements chromosomiques et, 631
  site spécifique, 630, 631
  structure de Holliday, 619, 620, 621, 628
  variation due à la, 793
Recombinant, 126
  double, 133
Région RTF des transposons,642
Régions d'attachement de l'ADN à l'armature, 498, 500
Règle de la somme, 31
Régression en génétique quantitative, 825-826
Réparation des défauts d'appariement, système de, 607-609
  chez *E. coli*, 611
Réparation par excision de base(s), 605-606
Réparation par excision de nucléotide, 604-605
Réparation par recombinaison, 609
  chez *E. coli*, 611
Répétition inversée, 630, 631
Répétitions en tandem, 785, 787
Répétitions en tandem en nombre variable (VNTR), 509-511, 512, 785, 787
Répliques, technique des, pour la sélection de mutants, 195-196
Réponse à la sélection, 844-845
Répresseur, 549-550
  lac, 547, 553-554, 565, 566
  multi-opéron, 564, 565
Répression catabolique, 554-555
Reptiles
  albinisme chez les, 99
  polyploïdes,
Rétinoblastome, 200, 201
Rétinoblastome oculaire héréditaire, 743
Rétro-inhibition, 560
Rétrorégulation, boucles, dans l'élaboration du plan d'ébauche, 750
Rétrotransposons, 511, 656
Rétrovirus, 653-655
  cycle vital des, 654
  dans l'identification des oncogènes, 739
  en thérapie génique, 481
Réverse, mutation, 182, 363, 584-585
Révolution Verte, 3, 7
Rh, locus, 803-804
Rho, facteur, 389, 390
Ribosomes, 384, 391, 399, 400, 405
Ribozymes, 412, 414
rII, gène
  analyse de la structure fine, 370
  cartographie par délétion, 364, 366, 367
  sites mutationnels, 367-369
Riz
  amélioration génétique, 40, 41
  ingénierie génétique, 3-4
Rouille des feuilles, résistance du blé à la, 266-267

S, gène, 101-102
S_1, phase du cycle cellulaire, 725, 726

SCUTARI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

S182, gène, 4
Saccharomyces cerevisiae,
chromosome 3 de, 536, 538
complexes cycline-CDK, 727
cycle cellulaire, 726, 727
ingénierie génétique, 467-472
Salmonella typhimurium, synthèse du tryptophane chez, 558, 559
Salmonella, variation de phase chez, 630, 631
Sanger, méthode de séquençage de l'ADN de,446-447
Satellite, ADN, 509
Sauvage, allèle de type, 67, 182
Schizosaccharomyces pombe,
cycle cellulaire, 726, 727
Scrapie, protéine prion de, 360
Secteur de mutant, 182
Segments dans la formation du profil, 749, 766-769
Ségrégation cytoplasmique, du génome extranucléaire, 666, 667
Ségrégation, 26, 167
dans l'analyse des tétrades linéaires, 163-166
dans les translocations, 229
mitotique, 167-168
Sélection, 797-802
artificielle, 805-807
différentielle, 844-845
directionnelle, 809-810
principe, 780
troncature, 806, 807
Semi-stérilité, 229-230
Séquençage au hasard en cartographie des chromosomes, 532, 533
Séquençage de l'ADN par attaque des bases, 444-446
Séquence initiale, 560
Séquence protéique intervenante (IVPS) dans l'épissage des protéines, 414, 415
Séquence signal dans la synthèse des protéines, 414, 415
Séquences activatrices amont, 566
Séquences marqueurs en cartographie chromosomique, 531, 532
Séquences régulatrices agissant en cis, 566
Séquences répétées inverses (IR), 641
Série allélique, 93-95
Sérine, 346
Serpents, couleur de la peau chez les, 102-103, 104
Sexduction, 290
Signalisation intercellulaire (systèmes de), 729-736
composants, 729-730
conformation des protéines dans la, 730
récepteurs des stéroïdes dans la, 730-0732
récepteurs transmembranaires dans la, 732-736
Signalisation intercellulaire paracrine (système), 730
Silenceurs, 695
SINE (courtes séquences répétées), 511
Site de clonage multiple, 431
Site de résolution interne, des éléments génétiques transposables, 645
*Sma*I, 427
Société, génétique et, 3-7
Solénoïde, conformation des nucléosomes, 497
Somatique, mutation, 182-183
Somatostatine, gène de, 462-463
Sommets adaptatifs, 810-811
Sondes pour les gènes clonés, 435-439
SOS, système de réparation, 564, 597-600, 609, 610
chez *E. coli*, 611
Souche test, 30
Souris
couleur du pelage, 102-103, 188, 189
détection des mutations chez, 188-189
fréquence de mutation, 192
gènes homéotique, 769-775
génétique du développement, 769-775
knock-out, 477-478, 479
thérapie génique, 480, 481
transgénique, 477-478, 479, 480
Southern, transfert de, 443, 444
du gène de l'hémoglobine des cellules falciformes, 483
en médecine légale, 510, 511
Spéciation, 811
Splicéosome, 412, 413
Spores sexuelles, 79, 160
Spores, 81
sexuelles, 79
Sporophyte, 81
SPZ-TOLL, complexe, 758-760
SRY/sry, gène, dans la détermination du sexe, 711-712
Stéroïdes
dans la régulation des facteurs de transcription, 573, 575
récepteurs des, 730-732
Stop, codons, 398-399
Streptococcus pneumoniae, 314, 315
Substitution de nucléotide dans la mutagénèse in vitro, 460-461
Supermutagène, 201
Superoxyde dismutase, 602
d'*E. coli*, 611
Suppresseur, mutation, 393, 402, 404-405
Suppresseurs de tumeurs, gènes, 600-601, 738
mutations récessives dans, 742-743
Suppression dans la production des phénotypes, 106
Surdominance, 803, 842
Surenroulement de l'ADN, 331, 332
Surface adaptative, 804-806
Sxl, gène, dans la voie de détermination du sexe chez *Drosophila*, 708-709
Synaptonémique, complexe, 59, 62
Syncytial, blastoderme, de *Drosophila*, 753
Syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA), 6
Syndrome de Cockayne, 612, 613
Synthétase, dans la synthèse des protéines, 399
Systèmes de signalisation, 729-736
composants, 729-730
conformation des protéines dans la, 730
récepteurs des stéroïdes, 730-732
récepteurs transmembranaires dans, 732-736

Tab, gène, de Drosophila, 704
Taches jumelées, 168-169
Tautomère, 586
Taux de mutation, 191, 196, 792
TDF, gène, 75
Télomère, 59, 213
Télophase
méiotique, 60, 62, 77
mitotique, 57, 58
Tenebrio
chromosomes de, 66
paire de chromosomes hétéromorphes chez, 66
Terminaison, codons de, 398-399
Test cis-trans, 373
Test spécifique de locus, 187-190
Tétrades, analyse des , 141, 159-166
linéaire, 161, 162-166
non ordonnée, 161, 166-167
profil de ségrégation à la deuxième division, 163-166
profil de ségrégation à la première division, 163, 165
Tetrahymena, autoépissage de l'ARN chez, 412, 414
TFIID, facteur, 570
Théorie chromosomique de l'hérédité, 56, 62-70
test critique, 68-70
Thérapie génique, 478, 480-482
cellules germinatives, 480, 481
cellules somatiques, 480-482
chez la Souris, 480-481
vecteurs adénoviraux, 481-482
vecteurs rétroviraux, 481
Thêta, structures, 326, 327
Thréonine, 346
Thymine mismatch-ADN glycosylase, 606
Thymine, 316, 317
Ti, plasmide, 473-475
Tomates
amélioration génétique, 40, 42
carte génétique, 136-137, 138-139
Topoisomérase dans la réplication de l'ADN, 327, 330-331, 332
Tradescantia, détection de mutation chez, 189
Traduction, 384, 389-391, 416-417, 418
blocage, 406, 407
étape d'élongation, 402, 403
étape d'initiation, 401-402
étape de terminaison, 402, 404-405
facteurs de relargage, 402, 404
régulation, 694
séquence signal, 414, 415
sites de liaison des ribosomes, 402
suppresseur de mutations non-sens, 402, 404
vue d'ensemble, 405-406
Trajet de transduction de signal, 729, 732-736
Transacétylase, 546
Transaminase, déficience en, 356
Transcriptase inverse, 653-655
Transcription, 384-389, 564-566
5-méthylcytosine et,575
contrôle en cis, 566-568
contrôle en trans, 568-573
initiation 387-388
phase d'élongation, 388, 389, 390
symétrie, 386
Transduction bactérienne, 298-301, 304
généralisée, 299-301
mesure de la liaison, 300-301
spécialisée, 299-300, 301
Transduction, 276
Transfection, 432, 739
Transfert chromosomique de gènes dans des hybrides, 529-530
Transfert de gène par irradiation et fusion en cartographie chromosomique, 530
Transformation, 276, 314, 315, 439-441

Transformation bactérienne, 276, 290-291, 304
Transformation virale, gènes de, 739
Transgène, 466
Transgéniques, organismes, 466-467, 476, 479, 480
Transgéniques, plantes, 473-475
Transition, mutation de, 586, 600
Translocation chromosomique, 217, 228-234. *Voir aussi à* Chromosomes, translocation
Transposons, 511, 640-644. *Voir auusi à* Eléments génétiques transposables
  mouvement,642-64644
  pour l'étiquetage de gènes, 442
  structure physique, 641-642
Transversion, mutation de, 586, 600
Trèfle (*Trifolium*), motifs de chevrons, 94, 95
Tri de chromosomes par fluorescence (FACS), pour la cartographie chromosomique, 532, 533
Triallélique, diagramme, 787-788
Trieur de cellules (FACS), utilisé pour la séparation de chromosomes, 532, 533
Trifolium (trèfle), chevrons du, 94, 95
Triploïdes, 252-253
  utilisations commerciales, 253, 257
Trisomie 13, 262
Trisomie 18, 262
Trisomie 21; 261-262
Trisomie, 261-263
Trithorax, gènes du groupe, 768
Triticale, 255, 256
Triticum aestivum, 255, 256
Trois facteurs, croisement-test à, 131-134
Troncature de sélection, 806, 807
Tropomyosine, 577
trp, opéron, 559-562
  atténuation, 561
Tryptophane synthétase A, séquence d'acides aminés, 347
Tryptophane synthétase, colinéarité dans, 352, 353
Tryptophane, 346
  gènes de la synthèse du, 559-562
  synthèse chez *Salmonella typhimurium*, 558-559
Tubuline, 721, 722
Tumeur, 183, 200. *Voir aussi à* Cancer
Turner, syndrome de, 259-260
TWIST, protéine, 759
Ty, élément, de la levure, 650, 655-656
Tyrosine kinases, récepteur de, 732
Tyrosine, 346

Ultrabithorax, 577
Ultraviolette, lumière, pour la mutagénèse, 599
Un gène—une enzyme, hypothèse, 373
Uniparentale, hérédité , 665, 667-671
Unité cartographique, 129, 131, 156
Uracile-ADN glycosylase, 606
Urogénital, système, 710
uvrABC, système exonucléasique codé par les gènes, chez *E. coli*, 611

v-erbB, oncogène, 740, 741
Valeur adaptative darwinienne, 798
Valeur adaptative, 797-802
  dépendante de la fréquence du génotype, 798
  indépendante de la fréquence du génotype, 798-799
  mesure, 799-800
  moyenne, 800-801
Valeur mi-parentale, 824, 825
Valine, 346
Variance
  additive, 842-843
  analyse, 832, 842-846
  composants, 844-845
  dominance, 842-843
  en génétique quantitative, 825
  environnementale, 832, 845
  génétique, 832
  interaction, 843
Variance d'interaction, 843
Variance due à l'environnement, 845
Variance génétique additive, 842-843
Variant, 40-43
Variation des sites de restriction, 784-785
Variation, 781-784
  aléatoire, 16-17
  consanguinisation et, 797
  continue, 37
  due à la recombinaison des chromosomes, 793
  migration et, 792-793
  principe de, 780
  sources de, 791-797
Vecteurs
  à réplication autonome, 472
  de levures,468-472
  navettes, 469
  plasmide Ti comme, 473-475
  pour la thérapie génique,
  pour le clonage des gènes, 430-434
Vecteurs navettes, 469
Vessie, cancer, 739-740
Viabilité, 799
Vieillissement, mutations dans l'ADN mitochondrial, 680
Villosités chorioniques, prélèvement, 482
Vimentine, 721, 722
Virus, 276, 653-655
  dans l'identification des oncogènes, 739
  en thérapie génique, 481
Virus de la mosaïque du tabac, mutation de la protéine de manteau, 407
Virus de Sendai, dans la production d'hybrides cellulaires somatiques hommes-rongeurs, 522-524, 525
Vision du monde, génétique et, 6-7
Voie du développement, 704-705
Voies de biosynthèse, 342-343
Votentilla fructosica, mutations de, 203

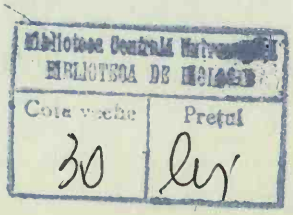
Western, transfert de, 443
Wx, gène, 658

X : A, rapport, dans la voie de détermination du sexe, 706-708
X et Y, liaison à l', 70
X, chromosome(s), 66-67
  carte génétique d, 142, 143
  d'*Homo sapiens*, 71
  dans la dystrophie musculaire de Duchenne, 231-232
  de *Drosophila hydei*, 502, 504
  de *Drosophila melanogaster*, 68, 69, 70, 507
  de *Melandrium album*, 71
  en dissection génétique, 202
  inactivation, 73-75, 699-700
  liaison génétique sur le, 70, 128-129, 142, 143
  maladies liées au(x), 71-73
  mosaïque du, 74
  non-disjonction du, 69
  régions différentielles, 70, 71
  translocation du, 231-232
X, liaison à l', 70, 128-129, 142, 143
X-fragile, syndrome de l', 591-592
Xanthine déshydrogénase, chez *Drosophila pseudoobscura*, 785
Xenopus, expériences de traduction chez, 407-408
Xeroderma pigmentosum, 200-201, 612,613
Xis, enzyme, 630
XO/XYY, mosaïque, 264-265

Y, chromosome(s), 66-67
  cartographie de, 532-533, 534
  d'*Homo sapiens*, 71
  dans la détermination du sexe, 710-712
  de *Drosophila melanogaster*, 64-67, 70
  de *Melandrium album*, 71
  liaison génétique sur le, 70, 75
  maladies liées à, 75
  régions différentielles, 70, 71
Y, liaison à l', 70, 75

ZEN, protéine, 759
Zerküllt, gène, 762
Zoo-blot, 535
Zygote,
  biparental, 671
  de *Drosophila*, 752-753
Zygotène, 58, 60
Zygotique, induction, 297

BCUAS | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



INTRODUCTION À L'ANALYSE GÉNÉTIQUE

• GRIFFITHS • MILLER •
• SUZUKI • LEWONTIN •
• GELBART •

L'*Introduction à l'analyse génétique*, pour rendre compte de l'évolution constante de la génétique contemporaine, ne cesse d'étendre la somme des matières présentées tout en poursuivant la démarche pédagogique entreprise dès les premières éditions.

L'ouvrage suit de très près les développements et les questions parfois éthiques qui se posent dans le domaine.

- La part de la génétique humaine s'est accrue dans la 6e édition, de façon à refléter l'importance croissante de l'Homme comme sujet d'étude.
- Tous les chapitres de **biologie moléculaire** ont été mis à jour de façon à rendre compte des résultats des recherches les plus récentes, particulièrement les chapitres consacrés à la technologie de l'ADN recombinant et à ses applications qui font une large part aux méthodes de clonage et à la thérapie génique.
- Les chapitres sur la **génétique du développement** et la **génétique des populations** ont été revus pour les rendre accessibles aux étudiants des premières années de Biologie.
- Un nouvel outil pédagogique fait son apparition : «Décomposons le problème» est une approche performante qui consiste à examiner à fond un problème avec les étudiants en leur posant de quinze à vingt questions sur un aspect spécifique de la génétique. Chaque question fait appel à un principe génétique différent.
- Les **concepts-clés** précèdent chaque chapitre de façon à préparer les étudiants aux principes qui seront abordés.
- Les **problèmes de synthèse** font appel à l'ensemble des matières présentées dans le livre, ce qui encourage les étudiants à intégrer les matières au fur et à mesure de leur acquisition.
- Les **diagrammes conceptuels** illustrent les relations entre les concepts et aident les étudiants à structurer leurs connaissances.
- A côté de **problèmes** très simples, d'autres demandent un raisonnement plus élaboré et constituent autant de tests d'évaluation de la connaissance de la matière.
- Les **problèmes résolus** à la fin de chaque chapitre montrent comment les généticiens appliquent les principes au traitement des données expérimentales.
- Des **messages** encadrés clôturent chaque section et servent de repères aux étudiants, leur permettant de s'assurer qu'il ont bien compris la matière présentée.

ISBN 2-7445-0002-X

SUZUKI B919